

UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal



**ESTUDIO DE LA CONGELABILIDAD DE LAS
MUESTRAS ESPERMÁTICAS DE CIERVO IBÉRICO
OBTENIDAS POST-MORTEM: FUENTES DE
VARIACIÓN**

TESIS DOCTORAL

Ana J. Soler Valls
Albacete, 2003

Ana J. Soler Valls

**ESTUDIO DE LA CONGELABILIDAD DE LAS MUESTRAS
ESPERMÁTICAS DE CIERVO IBÉRICO OBTENIDAS
POST-MORTEM: FUENTES DE VARIACIÓN**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
84-8427-315-6



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2005



**UNIVERSIDAD DE
CASTILLA - LA MANCHA**

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROFORESTAL
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

D. Jose Julián Garde-López-Brea, Doctor en Veterinaria, Catedrático de Universidad en el Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad de Castilla-La Mancha

INFORMA:

Que la presente memoria, titulada **“ESTUDIO DE LA CONGELABILIDAD DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS DE CIERVO IBÉRICO OBTENIDAS POST-MORTEM: FUENTES DE VARIACIÓN”** de la que es autora Dña. Ana Josefa Soler Valls, ha sido realizada bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora Ingeniero Agrónomo por la Universidad de Castilla-La Mancha (Programa de doctorado en Ciencias Agrarias, impartido por el departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Albacete).

Albacete, 11 de Julio de 2003

Fdo. D. J. Julián Garde López-Brea

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que a lo largo de un trabajo tan largo como la elaboración de una tesis doctoral han estado a tu lado enseñándote y apoyándote y sin las cuales la realización de este trabajo hubiera sido imposible.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor y amigo Julián Garde, el que un día confiase en mi dándome la oportunidad de trabajar con él. Gracias por todos los buenos consejos y valores que me has ido transmitiendo a lo largo de todos estos años y que han hecho que te conviertas en mi modelo profesional a seguir. Gracias por tu amistad y cariño sin los cuales esta tesis hubiese sido mucho más tediosa.

A Eduardo Roldán por que para mi ha sido un lujo el poder trabajar junto a él. Gracias por todas las enseñanzas que me has inculcado en el laboratorio y por las largas conversaciones en los viajes, gracias a las cuales he aprendido a tener una visión mucho más amplia y rica del mundo de la investigación.

A Aurelio Malo y Elena Peña. Por todas las noches compartidas en el laboratorio. Gracias Aurelio por toda tu ayuda con la estadística y con las bases de datos e intercambios de material.

A Montserrat Gomendio, Christian Gortazar, Joaquín Vicente y Manuel Álvarez y el resto de los “equipos” de Madrid y Ciudad Real. Gracias a todos por el trabajo conjunto en la toma de datos en el campo y por todos los “buenos” y “malos” ratos compartidos a la intemperie.

A M^a Dolores Pérez-Guzman. Gracias por toda la ayuda con la estadística y los buenos consejos que me has prestado en esta materia.

A todos los compañeros del área de Producción Animal y de la Granja de la ETSIA por toda la ayuda recibida durante todo el tiempo de mi permanencia en dicho departamento.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal por poner a mi disposición todo lo que he necesitado para llevar a cabo este trabajo.

A todos las personas que me han permitido de forma desinteresada la recogida de datos durante la época de monterías.

A mis tíos, Pepa y Manolo. Gracias por haber hecho posible mi estancia en Albacete la cual me ha sido de gran ayuda para desarrollar este trabajo en dicha ciudad.

A mis amigos, especialmente a Chon y Masiel. Gracias por haberme soportado todas las conversaciones “reproductivas” y por haber estado a mi lado en los momentos difíciles.

te

A mis padres y mis hermanos. Gracias por que sin vuestra ayuda no podría estar en este punto de mi carrera. Gracias por todo el esfuerzo realizado en los momentos difíciles.

A Fran. Gracias por compartir mis proyectos y sueños, por aceptarlos siempre de forma incondicional y animarme para que se conviertan en realidad.

Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio de Reproducción Animal de la E.T.S.I.A. de Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha) y ha sido financiada parcialmente por el proyecto de investigación RZ02-014 de la acción estratégica Conservación de los Recursos Genéticos de Interés Agroalimentario.

La autora ha disfrutado de la concesión de una beca para la realización del Doctorado subvencionada por la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

A mi padre

*No me siento descorazonado,
porque cada intento fallido
supone un nuevo paso adelante*

Thomas Edison

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
1. <u>LA CRIOBIOLOGÍA</u>	9
1.1. Principios básicos de la criopreservación	11
1.2. Daños producidos al espermatozoide durante la criopreservación	14
1.3. Factores responsables de los daños producidos en el espermatozoide durante la criopreservación	16
1.3.1. Factores dependientes de la técnica de criopreservación	17
1.3.1.1. Enfriamiento	17
1.3.1.2. Crioprotectores	20
1.3.1.3. Congelación y descongelación	22
1.3.2. Factores no dependientes de la técnica de criopreservación	24
1.3.2.1. Origen de los gametos	25
1.3.2.2. Fotoperiodo	27
1.3.2.3. Componente Genético	27
2. <u>MÉTODOS EMPLEADOS PARA VALORAR LA CALIDAD SEMINAL</u> ...	30
2.1. Determinación de la concentración espermática	31
2.2. Análisis de la movilidad espermática	31
2.3. Análisis de la integridad y de la funcionalidad de la membrana plasmática	33
2.4. Análisis de la integridad de la membrana acrosomal	34
2.5. Evaluación de la morfología espermática	36
2.6. Inducción de la reacción acrosómica	37
2.7. Prueba de resistencia térmica	37
2.8. Otras técnicas de evaluación seminal	38
3. <u>CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CIERVO</u>	39
3.1. Desarrollo tecnológico de la reproducción en cévidos	39
3.2. Métodos de obtención de las células espermáticas	40
3.2.1. Vagina artificial	41
3.2.2. Electroeyaculación	41
3.2.3. Recogida epididimaria post-mortem	42
3.3. Preservación de espermatozoides de ciervo	43

3.3.1. Diluyentes utilizados para la congelación de espermatozoides de ciervo.....	44
3.3.2. Tratamiento del semen de ciervo para su criopreservación	45
3.4. Aplicación de las técnicas de reproducción asistida en el ciervo ibérico	47
OBJETIVOS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. GAMETOS	57
2. ANÁLISIS DE LA CALIDAD SEMINAL.....	58
2.1. Volumen.....	58
2.2. Concentración espermática	58
2.3. Número total de espermatozoides	59
2.4. Movilidad espermática	59
2.5. Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática	60
2.5.1. Viabilidad espermática	60
2.5.2. Prueba de endósmosis celular	60
2.6. Estado del acrosoma	61
2.7. Morfología espermática	61
3. CRIOPRESERVACIÓN.....	62
4. DESCONGELACIÓN	62
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	63
5.1. <u>CARACTERÍSTICAS SEMINALES RELACIONADAS CON LA CONGELABILIDAD</u>	63
5.1.1. Evaluación de la calidad seminal en diferentes momentos del proceso de congelación e incubación	63
5.1.2. Inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio	64
5.1.3. Prueba de resistencia térmica.....	64
5.1.4. Análisis estadístico.....	65
5.2. <u>EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS AL MACHO SOBRE LA CONGELABILIDAD</u>	66
5.2.1. Parámetros extrínsecos al macho.....	66

5.2.2. Parámetros intrínsecos al macho	67
5.2.3. Análisis estadístico	68
RESULTADOS	85
<u>A. CARACTERÍSTICAS SEMINALES RELACIONADAS CON LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA.....</u>	87
A.1. Características seminales del material espermático obtenido post-mortem en el ciervo ibérico evaluadas en diferentes momentos del proceso de congelación	87
A.2. Determinación de la variable “congelabilidad global”	90
A.3. Relación entre la calidad seminal inicial y la “congelabilidad global”	92
A.4. Relación entre la calidad seminal evaluada después del proceso de congelación-descongelación y la “congelabilidad global”	93
A.5. Relación entre la inducción de la reacción acrosómica mediante el ionóforo de calcio A23187 y la “congelabilidad global”	94
A.6. Relación entre la calidad seminal evaluada después de una prueba de resistencia térmica y la “congelabilidad global”	98
<u>B. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS AL MACHO SOBRE LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA</u>	101
B.1. Efecto del mes de obtención de las muestras sobre la congelabilidad espermática	101
B.2. Efecto de los parámetros intrínsecos al macho sobre la congelabilidad espermática	102
DISCUSIÓN	109
<u>A. CARACTERÍSTICAS SEMINALES RELACIONADAS CON LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA.....</u>	111

A.1. Características seminales del material espermático obtenido post-mortem en el ciervo ibérico evaluadas en diferentes momentos del proceso de congelación	111
A.2. Determinación de la variable “congelabilidad global”	114
A.3. Relación entre la calidad seminal inicial y la “congelabilidad global”	116
A.4. Relación entre la calidad seminal evaluada después del proceso de congelación-descongelación y la “congelabilidad global”	121
A.5. Relación entre la inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio A23187 y la “congelabilidad global”	122
A.6. Relación entre la calidad seminal evaluada después de una prueba de resistencia térmica y la “congelabilidad global”	126
 <u>B. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS AL MACHO SOBRE LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA</u>	128
 B.1. Efecto del mes de obtención de las muestras sobre la congelabilidad espermática	128
B.2. Efecto de los parámetros intrínsecos al macho sobre la congelabilidad espermática	131
 CONCLUSIONES	139
 BIBLIOGRAFÍA	143
 ANEXOS	179

RESUMEN

El desarrollo de técnicas que permitan de una manera eficaz la criopreservación del semen de ciervo es un objetivo de gran interés tanto desde un punto de vista conservacionista como productivo. En países como Nueva Zelanda estas metodologías se aplican de forma rutinaria en algunas especies de cérvidos. Sin embargo, la mayoría de las veces se utilizan para la congelación de las muestras espermáticas de estas especies los mismos protocolos que han sido desarrollados para otras especies de rumiantes. En el caso del ciervo ibérico se han realizado trabajos previos en los que se han estudiado diferentes metodologías para determinar cuales son los mejores diluyentes para congelar el material espermático procedente de epidídimo. Además, se han evaluado diferentes velocidades de refrigeración, tiempos de equilibración, y velocidades de congelación y descongelación. Al mismo tiempo, también se ha estudiado el efecto que sobre la calidad seminal puede tener el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta que se procesa el material seminal.

No obstante, existen muchos aspectos desconocidos con respecto a la variabilidad existente en la congelación encontrada entre los distintos machos y que ha sido demostrada en diferentes especies. En el contexto en el que se mantiene el ciervo ibérico en nuestro país es difícil determinar las diferencias entre individuos en la resistencia a la congelación de sus espermatozoides debido a que las muestras obtenidas proceden de epidídimo. Por otra parte, no existe en ciervos ningún trabajo en el que se ponga de manifiesto que características propias del animal son las responsables del comportamiento de las células espermáticas frente al proceso de congelación. Por ello, en esta tesis se han estudiado que factores intrínsecos al macho tienen influencia sobre la resistencia a la congelación. Entre ellos se encuentran la edad, la variabilidad genética, la condición corporal y el grado de estrés. Al mismo tiempo, existen otras cuestiones que permanecen sin resolverse como la época del año en el que se pueden recoger las muestras espermáticas. El estudio de este factor se encuentra englobado dentro de los parámetros extrínsecos al macho que afectan a la congelabilidad.

Por otra parte, en la mayoría de los centros de inseminación las muestras seminales que inicialmente no tienen una alta calidad seminal en función de las pruebas espermáticas realizadas in vitro, son desechadas para su utilización en la congelación. Sin embargo, en el caso de especies en peligro de extinción o animales de un gran valor genético es imprescindible la conservación del material espermático independientemente de la calidad inicial de la que partan las muestras seminales. El principal aprovechamiento del ciervo ibérico es la cuerna y éste es un carácter altamente heredable. Por lo tanto, resulta de gran interés el poder congelar los espermatozoides de animales muertos con un alto valor productivo. Por ello, con el objeto de poder predecir la resistencia a la congelación de una muestra espermática antes de que ésta sea congelada se ha propuesto identificar como influye la calidad seminal en diferentes momentos del proceso de congelación y evaluada mediante varios test in vitro, sobre la resistencia a la congelación.

Así, en el primer apartado de este trabajo se estudió como influye la calidad seminal evaluada inicialmente y después de un proceso de congelación-descongelación sobre la resistencia a la congelación. Para ello, se creó una variable indicativa de resistencia a la congelación a la que se llamó congelabilidad global. Esta variable se creó para reducir el número de variables a solamente una y fue el resultado de un análisis de componentes principales en el que se utilizaron las tasas de resistencia a la congelación para la movilidad, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, el porcentaje de espermatozoides que responden a un test hipoosmótico y para el porcentaje de espermatozoides vivos. Los resultados mostraron que los parámetros evaluados inicialmente que estuvieron relacionados de forma positiva con la congelabilidad global fueron: la concentración, el número total de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides móviles, la calidad del movimiento y el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en posición distal, mientras que la presencia de espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal lo estuvo de forma negativa. Los parámetros evaluados después de un proceso de

congelación-descongelación que estuvieron relacionados de forma positiva con la congelabilidad global fueron: el porcentaje de espermatozoides móviles, la calidad del movimiento, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, el porcentaje de los que responden a un test hipoosmótico y el porcentaje de espermatozoides vivos. Los parámetros seminales evaluados después de la congelación-descongelación explicaron mucho más de la variabilidad observada en la congelabilidad global que los parámetros indicativos de calidad inicial del semen.

Por otra parte, dentro de este mismo apartado se pretendió determinar si las variables de calidad seminal estimadas después de la realización de otras pruebas in vitro explicaban la congelabilidad global. De este modo, se realizaron un test de inducción de reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio y un test de resistencia a un estrés térmico con las muestras de semen fresco. Los resultados mostraron una relación negativa entre el porcentaje de acrosomas reaccionados a los 5 y 10 minutos y la congelabilidad global. Por el contrario, se obtuvo una relación positiva entre la resistencia para la movilidad a los 60 y 120 minutos después de una prueba de resistencia térmica y la congelabilidad global. Estas relaciones no fueron muy fuertes, quedando la mayor parte de la variabilidad observada en la congelabilidad global sin explicar.

En el segundo apartado se estudiaron los valores de las tasas de resistencia a la congelación en función del parámetro extrínseco, mes de obtención de las gónadas así como, para los parámetros intrínsecos: edad, consanguinidad, condición corporal y grado de estrés. Así mismo, se evaluó la influencia del mes de obtención de las gónadas y de los parámetros intrínsecos sobre la congelabilidad global mediante análisis de regresión. Para el mes de obtención de las gónadas, los resultados obtenidos mostraron la evaluación de las diferentes tasas de resistencia a la congelación durante los meses estudiados. De este modo, los valores para la resistencia a la congelación de la movilidad, los acrosomas normales, el

porcentaje de espermatozoides que responden a un test hipoosmótico y el porcentaje de espermatozoides vivos fueron menores durante los meses de enero y febrero. Igualmente, cuando se estudió el efecto del mes de obtención de las gónadas sobre la congelabilidad global se observó que en los meses de noviembre y diciembre la congelabilidad global fue mayor que en octubre, enero y febrero entre los cuales no se encontraron diferencias significativas.

Por otra parte, para la realización de los siguientes análisis se utilizaron las muestras espermáticas obtenidas durante los meses de noviembre y diciembre, puesto que entre estos meses no se observaron diferencias significativas en la congelabilidad global y el valor de dicha variable fue mayor que para los meses de octubre, enero y febrero. Para las tasas de resistencia a la congelación se observó que las relaciones entre ellas y los parámetros intrínsecos fueron negativas excepto para la relación entre la resistencia a la congelación para la movilidad y la d^2 media y para la resistencia a la congelación para los porcentajes de espermatozoides con acrosoma normal y de vivos con la edad. Por otra parte, cuando se realizó el análisis de regresión múltiple para estudiar como afectaban los parámetros intrínsecos a la congelabilidad global, se obtuvo que la variabilidad genética, la condición corporal y el grado de estrés influyeron de forma negativa y significativa sobre la variable de congelabilidad global, siendo la condición corporal el parámetro que explicó una mayor variabilidad de la variable dependiente. Sin embargo, la edad no tuvo ninguna influencia sobre la congelabilidad global.

INTRODUCCIÓN

1. LA CRIOBIOLOGÍA

La criobiología es una ciencia relativamente reciente. Sin embargo, ya en 1776 Spallanzani observó que los espermatozoides de rana, hombre y perro sobrevivían después de haberlos mantenido en nieve durante 30 minutos. A pesar de ello, el éxito del proceso de congelación se debe principalmente a Polge y sus colaboradores puesto que en los años 50 descubrieron que la adición de glicerol a los medios utilizados para congelar los espermatozoides, disminuía el daño que se producía a las células espermáticas durante este proceso (Polge et al., 1949). Desde entonces, se ha avanzado mucho en este campo y las técnicas utilizadas en los primeros momentos han sido totalmente sustituidas en la actualidad por otras más efectivas.

Mediante la disminución de la temperatura por debajo del punto de congelación es posible mantener diversos tipos de células y tejidos de forma indefinida en bancos de recursos genéticos (GRB). Ello ha permitido un gran avance en el desarrollo de las técnicas reproductivas aplicadas a los animales domésticos. Además, esta es una de las técnicas esenciales utilizadas en los programas de conservación de animales en peligro de extinción (Holt, 1997a; Watson, 2000; Leibo y Songsasen, 2002). La creación de bancos de recursos genéticos presenta una serie de ventajas. En primer lugar, permite el movimiento de material genético de forma fácil y barata. Por otra parte, algunas veces interesa mantener animales de un sexo determinado o mantener un número reducido de animales por problemas de espacio como es el caso de los zoológicos, pudiendo realizar una gestión mucho más efectiva si se dispone de un banco de recursos genéticos.

Una de las células que ha sido congelada desde el comienzo del desarrollo del proceso de congelación es el espermatozoide. A pesar de ello, existen

especies en las que la congelación de estas células no resulta exitosa. Ello es debido principalmente a que el espermatozoide es una célula muy especializada y con una morfología particular (Millette, 1999). Por otra parte, para obtener células espermáticas funcional y estructuralmente maduras es necesario conocer la fisiología reproductiva de la especie en cuestión, siendo un paso imprescindible para la conservación de cualquier especie (Wildt et al., 1995). Muchos de los trabajos sobre congelación de espermatozoides en diferentes especies de animales han sido estudios empíricos. Sin embargo, cada vez se realizan más trabajos orientados a descubrir las causas responsables del daño en los espermatozoides tras la criopreservación y como se pueden minimizar esos efectos dañinos (Holt, 1997).

En los trabajos llevados a cabo para mejorar la congelación de las células espermáticas se han estudiado que velocidades de enfriamiento, temperaturas y tiempos de equilibración, velocidades de congelación y descongelación son las más idóneas para una especie en cuestión, puesto que existen diferencias interespecie. Esto es debido principalmente a la diferente composición de la membrana del espermatozoide, así como a diferencias en la morfología de las células espermáticas (Holt, 2000). Del mismo modo, se han llevado a cabo estudios para determinar que época del año es la mejor para llevar a cabo el proceso de congelación (Fiser y Fairfull, 1983, 1986). Sin embargo, una vez aplicado el mejor protocolo para congelar espermatozoides de una especie determinada, se observa que existen variaciones intraespecie. Una de las causas de las diferencias en la congelación encontradas entre animales pueden ser la edad. Así, determinados autores han encontrado que en animales de mayor edad se obtienen valores mayores de supervivencia de las células espermáticas tras la descongelación (Kosiniak y Bittmar, 1987; Karabinus et al., 1990). A pesar de ello, cuando se utilizan animales con edades similares se siguen reportando diferencias en la resistencia de los espermatozoides a la congelación. Estas diferentes susceptibilidades de las células espermáticas a la criopreservación parecen tener una base genética (Thurston et al.,

2001; Medrano et al., 2002; Thurston et al., 2002a, b). No obstante existen pocos trabajos en los que se haya estudiado el efecto del componente genético sobre la congelabilidad. Además la mayoría de los trabajos realizados se ha llevado a cabo con un número pequeño de animales.

Por otra parte, las investigaciones realizadas en el campo de la criobiología suelen ser efectuadas con animales que están bajo un estricto control, con unas condiciones ambientales y alimenticias determinadas. Además, suelen ser machos acostumbrados al manejo y por lo tanto poco sensibles al estrés. Sin embargo, esto no ocurre en especies salvajes en las cuales existen una serie de factores que el investigador no controla (alimentación, estrés, etc...) siendo posible testar si estos caracteres influyen sobre la resistencia a la congelación de las células espermáticas.

Puesto que la criopreservación de las células espermáticas actualmente es una herramienta imprescindible para el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida, es necesario una investigación profunda de los factores que afectan a al proceso de congelación, tanto de aquellos que estén relacionados con la técnica de congelación es sí, como aquellos no relacionados con la misma.

1.1.Principios básicos de la criopreservación

Cuando una solución es enfriada por debajo de su punto de congelación, es inicialmente sobreenfriada, es decir se mantiene líquida a una temperatura más baja que la de del punto de equilibrio de su congelación. Esta situación es inestable y si la temperatura sigue disminuyendo es muy probable que se incrementen los fenómenos de nucleación y por lo tanto comiencen a formarse cristales de hielo (Watson y Fuller, 2001). La nucleación se genera de forma espontánea y depende del volumen de la solución, del grado de sobreenfriamiento y de la concentración y la presencia de impurezas que puedan actuar como agentes nucleadores. Al aumentar la

formación de cristales de hielo aumenta la concentración de solutos, ya que el agua pura cristaliza formando cristales de hielo y la solución que se mantiene líquida cada vez es menor puesto que el núcleo de hielo va aumentando de tamaño. La osmolaridad registrada en esta solución líquida remanente puede llegar a ser incluso 20 veces más elevada cuando la temperatura se aproxima a -40°C (Mazur et al., 1981). Bajo este rango de temperaturas la pequeña solución que quedaba líquida, finalmente se congela (Watson y Fuller, 2001).

Si la solución contiene células en suspensión se produce un intercambio de agua a través de la membrana plasmática entre el medio intra y extracelular. A una temperatura de -15°C las células permanecen superenfriadas a pesar de que el medio extracelular esté congelado debido a que la membrana plasmática impide el crecimiento de los cristales de hielo (Mazur, 1984). De este modo, el potencial químico del agua superenfriada en el interior de la célula es mayor que el del agua que hay en el exterior de la misma y en respuesta a esta diferencia de potencial, el agua fluye fuera de la célula y se congela externamente.

Los eventos físicos que ocurren en las células espermáticas durante la congelación dependen de la velocidad de enfriamiento. Si el enfriamiento es lo suficientemente lento, la célula es capaz de perder agua para concentrar los solutos intracelulares y eliminar el superenfriamiento manteniendo el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el del agua extracelular. El resultado final es que la célula se deshidrata y no se forma hielo en el interior de la misma. Por el contrario si la célula se enfría muy rápidamente ésta no es capaz de perder suficiente agua para mantener el equilibrio, aumentando el superenfriamiento y registrando el equilibrio por la congelación del hielo intracelular (Mazur, 1984). La formación de cristales de hielo no es deseable puesto que se produce un efecto perjudicial para la célula. Sin embargo, si ésta se ha congelado a una velocidad de enfriamiento muy rápida es mucho más sensible a una

descongelación lenta, recuperándose más células vivas con velocidades de descongelación rápidas. Los cristales de hielo que se forman en el interior de la célula durante la congelación rápida tienden a ser pequeños. Estos cristales son muy inestables y tienen un punto de fusión a temperaturas más bajas. Durante la descongelación los pequeños cristales tienden a agregarse formando grandes cristales de hielo, proceso conocido como recristalización. Por ello, una velocidad de descongelación lenta es perjudicial cuando la congelación ha sido rápida puesto que da tiempo a que ocurra la recristalización (Mazur, 1984).

Por otra parte, si el enfriamiento es muy lento puede ser perjudicial para la célula. Esto es debido a que la célula está más tiempo expuesta a los solutos que se acumulan en la fracción de agua sin congelar. Por lo tanto, controlando la velocidad de congelación se puede evitar el daño celular. Además, conociendo la permeabilidad de la célula al agua y su energía de activación es posible, mediante ecuaciones, determinar la velocidad de enfriamiento óptima compatible con el equilibrio osmótico y establecer el mejor protocolo de criopreservación. Muchos investigadores han medido la permeabilidad de las membranas del espermatozoide en diferentes especies de animales. Sin embargo, cuando esas permeabilidades son utilizadas en las ecuaciones dan lugar a unas velocidades de enfriamiento mucho más altas de las que se sabe que son óptimas de forma empírica (Watson, 2000). Esto puede ser debido a diferentes causas que no se han tenido en cuenta en el desarrollo de las ecuaciones. Así, la permeabilidad de la membrana puede cambiar cuando se añade el crioprotector, o incluso la permeabilidad de la membrana depende de la región de la misma. También es posible que las técnicas para medir la permeabilidad sobreestimen los valores. Por último, la energía de activación sobre 0°C puede ser diferente a aquella bajo esta temperatura (Watson, 2000).

1.2. Daños producidos al espermatozoide durante la criopreservación

La criopreservación produce daños sobre las membranas espermáticas, el citoesqueleto, la estructura responsable de la movilidad y el núcleo. Durante la congelación, todas las membranas del espermatozoides son susceptibles de sufrir daño, tanto la membrana plasmática, como la membrana acrosomal externa y la mitocondrial (Watson, 1995). Las membranas del espermatozoide son únicas con respecto a la composición de fosfolípidos y colesterol. La función de las mismas está determinada por la interacción de los componentes que la forman y cualquier hecho que afecte esas interacciones dará lugar a una función alterada. La membrana está formada por una bicapa fluida con una distribución de lípidos-proteínas característica. Aunque los lípidos y las proteínas presenten asociaciones entre ellos dando lugar a una configuración determinada, no están covalentemente unidos y si la membrana sufre algún estrés estas asociaciones pueden alterarse, cambiando la configuración de la membrana y dando lugar a una función anormal e incluso a la ruptura de la misma (Parks y Graham, 1992). De este modo, cuando las membranas se enfrían por debajo de la temperatura de transición de los lípidos que las componen, se produce un cambio de fase de los mismos desde un estado cristalino a una fase de gel y empiezan a agregarse formando microdominios (Holt y North, 1986, 1991). Esto favorece las asociaciones al azar con otros lípidos y la formación de uniones así como, de zonas muy inestables entre los dominios de lípidos en estado líquido y de gel, lo que facilita la ruptura de la membrana (Amann, 1999). Estos eventos de cambios de fase son revertidos tras la descongelación aunque muchas veces, no todos los lípidos y proteínas vuelven a su localización original (Amann, 1999). Por otra parte, las proteínas quedan enclaustradas entre los lípidos. Si estas proteínas son canales iónicos y se altera la estructura de la mismas afecta a la funcionalidad de la membrana (Watson, 2000). Por lo tanto, la permeabilidad se modifica por la disminución de la temperatura pudiendo ser debido a una rotura de la membrana, aunque también es posible que se deba a los canales proteicos específicos que se encuentren

modificados estructuralmente. De esta forma, se ha observado que tras el enfriamiento la regulación de los niveles intracelulares de calcio es anormal (Bailey y Buhr, 1995). La entrada controlada de calcio al interior del espermatozoide tiene un papel fundamental en la regulación de procesos como la reacción acrosómica. De este modo, la entrada de calcio por la congelación induce cambios en el espermatozoide similares a los que ocurren durante la capacitación (Critser et al., 1987; Garde, 1993). Por otra parte, algunos fosfolípidos están orientados hacia el interior de la bicapa y otros hacia el exterior. Cuando se produce un reordenamiento de los componentes de la membrana debido a la exposición a las bajas temperaturas puede dar lugar a una orientación distinta de la normal, provocando una alteración en la estabilidad de la misma (Hammerstedt et al., 1990). Por lo tanto, la estructura de la membrana tiene que permanecer íntegra no solo para mantener la viabilidad de la célula, sino porque la organización especial de sus componentes es imprescindible para el reconocimiento entre células y para llevar a cabo los procesos de fusión de membranas durante la fertilización (Millette, 1999).

La membrana tiene una gran cantidad de ácidos grasos insaturados que son muy susceptibles de sufrir peroxidación lipídica (Aitken, 1995). Cuando se produce este proceso los ácidos grasos, que son esenciales para dar a la membrana la fluidez que necesita, se pierden. Una alta peroxidación lipídica produce la disminución de la movilidad y de la capacidad de fertilización, la inhibición de la respiración, la pérdida de enzimas intracelulares y el daño estructural a la membrana particularmente en la región del acrosoma (de Lamirande y Gagnon, 1992a, b; Aitken, 1995). Los procesos de criopreservación aumentan la peroxidación lipídica (Alvarez y Storey, 1992; Chatterjee y Gagnon, 2001) y por lo tanto producen una disfunción del espermatozoide.

Otra estructura susceptible de ser dañada tras la congelación, es el citoesqueleto. Muchas de las proteínas presentes en el citoesqueleto se

despolimerizan o repolimerizan a determinadas temperaturas, pudiendo contribuir a una desorganización de las membranas (Holt y North, 1991).

Con respecto a la estructura responsable de la movilidad dicho parámetro puede disminuir como consecuencia de los cambios de permeabilidad en la membrana plasmática de la región de la cola, aunque también puede ser debido a la alteración de la disponibilidad de energía o el daño en la región del axonema. Así, tras la congelación se ha observado una gran cantidad de cristales de hielo en la mitocondria y alteraciones en la membrana de la misma así como, daños producidos en los brazos radiales del axonema (Courstens et al., 1989; Windsor y White, 1995; O'Connell et al., 2002).

Por último, también se han observado daños en el núcleo del espermatozoide debido a la criopreservación (Royere et al., 1996). Principalmente se produce una descondensación de la cromatina. Las alteraciones del ADN en los espermatozoides causadas por la congelación han sido estudiadas por Karabinus et al. (1990), Royere et al. (1991), Hammadeh et al. (1999) y Hammadeh et al. (2001). Utilizando espermatozoides congelados existe una mayor posibilidad de muerte embrionaria (Salomon y Maxwell, 1995b), pudiendo deberse este hecho a los daños producidos en el ADN.

1.3 Factores responsables de los daños producidos en el espermatozoide durante la criopreservación

La máxima supervivencia de las células espermáticas después de experimentar un estrés como el producido por la congelación, depende de varios aspectos que podemos agrupar en dos clases. Por un lado, tenemos todos los factores relacionados con la técnica de congelación. Otro grupo, está representado por aquellos factores que no están relacionados con la técnica en sí. Dentro de este segundo grupo tenemos los factores que son intrínsecos al animal y aquellos que son extrínsecos al mismo.

1.3.1. Factores dependientes de la técnica de criopreservación

En el proceso de congelación las células espermáticas experimentan diferentes situaciones de estrés en las determinadas fases de dicho proceso. Las etapas en las que los espermatozoides son susceptibles de ser dañados son: en primer lugar durante el enfriamiento en el que se produce una disminución de temperatura de la muestra espermática, en segundo lugar cuando tiene lugar la adicción de los crioprotectores al diluyente antes llevar a cabo el proceso de congelación y en tercer lugar durante la congelación y descongelación. En los siguientes apartados se expone lo que ocurre en cada paso del proceso de congelación y como minimizar el daño producido a las células.

1.3.1.1. Enfriamiento

Cuando los cambios de temperatura entre 30°C y 0°C son muy bruscos se produce lo que se denomina “choque frío” (Quinn et al., 1968). Los daños producidos por el choque frío dependen de la velocidad de enfriamiento, del intervalo de temperaturas y del rango de temperaturas, siendo más severo entre 12°C y 2°C (Watson, 1981a). Los signos más obvios de este proceso incluyen la pérdida de movilidad de los espermatozoides (Quinn et al., 1968; Holt et al., 1988; White, 1993), de la integridad de las membranas espermáticas y del funcionamiento celular (Watson y Martín, 1972; Watson, 1979). Esto parece ser debido a los cambios de fase que se producen en los lípidos y que son los responsables de que se altere la permeabilidad de la membrana del espermatozoide (Drobnis et al., 1993).

La sensibilidad al choque frío es diferente en los espermatozoides de las distintas especies de animales, ya que el rango de temperaturas en el que se produce los cambios de fase de los lípidos varía entre ellas (Parks y

Lynch, 1992; Drobnis et al., 1993). Además, incluso para una misma especie la membrana puede estar constituida por diferentes lípidos con múltiples cambios de fase a diferentes temperaturas (Holt y North, 1986). Por otra parte, la diferente susceptibilidad entre las especies también puede ser debida al diferente porcentaje de ácidos grasos insaturados frente a saturados en los fosfolípidos. De este modo, las membranas de los espermatozoides de bovino, ovino y porcino tienen un porcentaje de 2,5 a 3 mientras que la de los de conejo, perro, humano y aves tiene una proporción de solamente 1. Así, las especies del primer grupo son más susceptibles al choque frío que las del segundo (White, 1993). Por otra parte, un bajo contenido en colesterol también influye en una menor resistencia al choque frío (Darin-Bennett y White, 1977). Además, el alto contenido en ácidos grasos insaturados de las membranas de los espermatozoides los hace susceptibles de peroxidación lipídica en presencia de oxígeno (Hammerstdt et al., 1993; Aitken, 1995).

Para evitar el daño producido por el choque frío hay que seleccionar la mejor velocidad de enfriamiento y calentamiento, además de añadir sustancias que protejan al espermatozoide como la yema de huevo (Amann, 1999). La disminución de la temperatura de forma rápida desde temperatura ambiente hasta 0, 5, 10 o 15°C produce un aumento de calcio intracelular con respecto a las muestras en las que la disminución de temperatura se realizó de forma lenta (Watson, 1981a; White, 1993). Este aumento de calcio presumiblemente indica un daño a nivel de la membrana plasmática. Por lo tanto, es necesario disminuir la temperatura de forma lenta para que la membrana del espermatozoide se vaya adaptando a las bajas temperaturas. Las velocidades de enfriamiento más adecuadas son aquellas, que reducen la temperatura de las muestras espermáticas desde temperatura ambiente hasta 5°C, de forma homogénea en periodos de tiempo que varían entre una y tres horas (Graham et al., 1978; Fiser y Fairfull, 1984). Además, en muchas especies es necesario mantener la muestra espermática a una temperatura baja, generalmente a 5°C, y durante un tiempo determinado antes de congelar y que se ha denominado

periodo de equilibración (Salomon y Maxwell, 1995a). Los tiempos de equilibración comprendidos entre 30 min y 2 h reportan viabilidades del semen descongelado superiores a cuando se prolonga este tiempo (Patt y Nath, 1969; Jones, 1969). Además, el proceso de enfriamiento y el de equilibración deben de considerarse conjuntamente, ya que no son necesariamente dependientes (Jones, 1969).

Por otra parte, en otras especies como por ejemplo el porcino la simple incubación de los espermatozoides a temperatura ambiente les confiere cierto grado de resistencia frente al choque frío (Tamuli y Watson, 1994).

Una de las sustancias más efectivas frente al daño producido por el choque frío es la yema de huevo y por ello es comúnmente incluida en los diluyentes utilizados para la congelación del semen (Holt, 2000a). El componente de la yema de huevo que protege a la membrana espermática frente al choque frío es la lipoproteína de baja densidad (Watson, 1981b), aunque el modo de acción de dicho compuesto todavía no es conocido. Mediante la adicción de yema de huevo a los diluyentes se evita que a los espermatozoides se les doble el flagelo a nivel de la pieza intermedia (Holt et al., 1988). Existen dudas si la yema de huevo modifica el comportamiento de los lípidos durante los cambios de fase. Parece que la resistencia al choque frío por parte de esta sustancia se atribuye a una unión con la superficie de la célula, modificando la permeabilidad de la misma (Holt, 2000a). Al modificarse la permeabilidad se impide la entrada de calcio y el aumento intracelular de este ión, impidiendo las consecuencias nefastas que conlleva la entrada de gran cantidad de calcio al interior de la célula (Robertson y Watson, 1987).

1.3.1.2. Crioprotectores

Para el almacenamiento y reducción de la temperatura del semen, es necesario emplear medios diluyo-conservadores apropiados, que protejan a la célula espermática de los daños ocasionados por el proceso de congelación y descongelación. Los medios deben presentar una serie de características generales que permitan la recuperación de un porcentaje elevado de espermatozoides a la post-descongelación. Así, deben cumplir unos requisitos de pH, capacidad tampón, osmolaridad, fuerza energética, fuerza iónica y crioprotección (Bearden y Fuquay, 1997).

Una de las sustancias que se añaden a los diluyentes para minimizar los daños producidos en las células espermáticas durante la congelación-descongelación son los crioprotectores. Los agentes crioprotectores se dividen en dos grupos: en primer lugar están los denominados penetrantes (glicerol, dimetilsulfóxido y etilenglicol) que son aquellos que atraviesan la membrana plasmática y actúan tanto intra como extracelularmente y en segundo lugar los no penetrantes entre los que se encuentran los azúcares (lactosa, trealosa, rafinosa), las proteínas (de la leche y yema de huevo) y los polímeros sintéticos (metil celulosa y amidas) (Hammersdet et al., 1990; Amann, 1999). El glicerol es el crioprotector penetrante más efectivo para la congelación del semen en la mayoría de las especies. Este crioprotector se comporta como un soluto causando un flujo osmótico de agua y como un solvente disolviendo las sales y los azúcares. Cuando actúa como solvente disminuye el punto de congelación por debajo del que tiene el agua. De este modo, cuando el semen es criopreservado los cristales de agua pura se congelan y forman bloques de hielo entre canales de solvente sin congelar que contiene a los solutos y a los espermatozoides. Por lo tanto, a cualquier temperatura hay más espacio para los espermatozoides que se encuentran en la fracción sin congelar y además la concentración de solutos es menor puesto que están disueltos en más líquido (Amann, 1999).

Cuando el glicerol actúa como soluto se pueden producir daños en las células puesto que dicho crioprotector induce un flujo de agua a través de la membrana plasmática. Así, cuando se añade al diluyente se produce una deshidratación de las células espermáticas debida a la salida de agua. Inmediatamente después los espermatozoides recuperan su volumen original como consecuencia de la entrada del crioprotector en la célula. Por otra parte, otro cambio de volumen debido a la acción del glicerol ocurre cuando los espermatozoides son transferidos al tracto reproductivo de la hembra donde la presión osmótica es menor que la que hay en el interior de la célula y por lo tanto entra agua al interior de la misma más rápidamente de lo que sale el glicerol al medio extracelular puesto que los crioprotectores pasan más lentamente a través de la membrana de lo que pasa el agua (Amann, 1999). Por lo tanto, la membrana se tiene que acomodar a estos cambios de volumen. Existen diferencias entre especies con respecto a la sensibilidad de la membrana al transporte de agua a través de la misma (Curry y Watson, 1994). Estas diferencias son importantes para determinar la resistencia a la congelación. En la especie humana se ha demostrado que la adición y eliminación del glicerol en varios pasos causa menos daño que si se realiza en uno solo (Gao et al., 1995). Igualmente en equino la eliminación rápida de este crioprotector disminuye la movilidad y la integridad de la membrana (Ball y Vo, 2001). Sin embargo, en otras especies como la ovina la adición y retirada del crioprotector en un único paso no afecta negativamente la viabilidad celular (Fiser y Fairfull, 1989).

La temperatura a la cual se incorpora el glicerol al diluyente también es importante. De este modo, en determinadas especies se ha observado que la supervivencia de los espermatozoides es mayor cuando la adicción se realiza a bajas temperaturas (Fiser y Fairfull, 1989). Esto puede ser debido al efecto tóxico del glicerol puesto que al añadirlo al principio del proceso permanece más tiempo en contacto con las células, además de que la toxicidad de los crioprotectores a altas temperaturas es mayor. El efecto tóxico del glicerol depende de la especie animal de la que provengan los

gametos. Así, se ha demostrado el efecto tóxico de este crioprotector en espermatozoides de porcino y ratón (Fiser y Fairfull, 1990; Katkov et al., 1998).

Por otra parte, la concentración final de glicerol en el diluyente influye en la calidad espermática obtenida después de la congelación (Buhr et al., 2001). La concentración óptima a incorporar en los diluyentes de congelación, depende de una serie de factores entre los destacan las velocidades de congelación y descongelación (Robbins et al., 1976; Fiser et al., 1993).

Por lo tanto, dependiendo de la especie en cuestión tendremos que determinar la tasa óptima así como, los pasos en los que se añade y se elimina el crioprotector y la temperatura a la cual se añade para que el daño producido en los espermatozoides sea mínimo.

1.3.1.3. Congelación y descongelación

Cuando la temperatura disminuye por debajo de 0°C el agua presente en el diluyente comienza a congelarse, aumentando la proporción de agua que se congela a medida que la temperatura decrece. La membrana de la célula actúa como una barrera que impide que los cristales de hielo entren en su interior. Por otra parte, la concentración de solutos en la fracción de agua que queda sin congelar cada vez es mayor y provoca un aumento de la fuerza osmótica. Debido a ello, el agua intracelular fluye hacia el exterior de la célula y ésta se deshidrata. Cuando se llega a un equilibrio entre el medio extra e intracelular con respecto a la concentración de solutos, la célula deja de deshidratarse (Amann, 1999). La proporción de agua que cristaliza en forma de hielo y por lo tanto la fuerza osmótica que genera la solución sin congelar dependerán de la temperatura. Así, cuando la

temperatura es más baja, menor es la fracción de agua sin congelar y por lo tanto mayor es la fuerza osmótica. Este suceso se puede evitar con velocidades de enfriamiento rápidas. Sin embargo, la velocidad de enfriamiento debe de ser lo suficientemente lenta para permitir que salga el agua del interior de la célula evitando la formación de hielo intracelular el cual es letal para el espermatozoide. Así, se ha demostrado que cuando los espermatozoides se congelan, éstos experimentan una curva de supervivencia en forma de U invertida (Watson, 1979). Por otra parte, las células enfriadas a velocidades por debajo de las óptimas están demasiado tiempo expuestas a la alta concentración de solutos que queda en la fracción sin congelar. A este fenómeno se le denomina “efecto solución” (Mazur et al., 1972). El incremento en la solución de solutos produce la desnaturalización de las proteínas de la membrana plasmática y la deshidratación celular, disminuyendo el volumen de la célula hasta un mínimo donde se compromete la viabilidad estructural de la misma (Watson y Duncan, 1988). Como se ha comentado anteriormente, si la permeabilidad de la membrana y su energía de activación se conocen es posible determinar la velocidad máxima compatible con el equilibrio osmótico y determinar el mejor protocolo de congelación (Mazur, 1984). Sin embargo, aplicando las fórmulas correspondientes se ha observado que las velocidades de congelación obtenidas mediante estas ecuaciones son mucho mayores que las que se utilizan de forma empírica (Curry et al., 1994).

Como se ha descrito anteriormente, durante el proceso de criopreservación se producen cambios de volumen en las células espermáticas asociados a los flujos osmóticos que tienen lugar durante la congelación-descongelación. Durante la descongelación se produce de nuevo un flujo osmótico hacia el interior celular. De este modo, se ha demostrado que la pérdida de movilidad e integridad de la membrana de los espermatozoides se manifiesta durante la descongelación (Holt et al., 1992). Además, las células espermáticas se dañan más por la entrada que por la salida de agua (Curry y Watson, 1994), evento que ocurre durante la descongelación.

Así, la velocidad a la cual entra el agua en el interior de la célula es responsable de los daños producidos al espermatozoide durante la criopreservación (Curry y Watson, 1994), puesto que se necesita un periodo de acomodación para el nuevo volumen. Esta masa de agua que entra rápidamente en la célula puede provocar una fractura de los elementos del citoesqueleto (Watson, 1995).

Hay que tener también en cuenta que existe una interacción entre la velocidad de congelación y la de descongelación (Henry et al., 1993). De este modo, si la congelación ha sido muy rápida y se han formado cristales de hielo, al descongelar de forma lenta se permite la unión de los pequeños cristales que aumentarán de tamaño y producirán lesiones a los espermatozoides. Este fenómeno se conoce con el nombre de “recristalización” (Mazur, 1984). Sin embargo, si la descongelación se realiza de forma rápida cuando la congelación también lo ha sido, se pueden recuperar muchas células espermáticas. Por otra parte, si la congelación se ha realizado de forma lenta, una descongelación rápida produce un choque osmótico (Mazur, 1984) como consecuencia de la entrada en la célula de un exceso de solutos. Durante la congelación con velocidades lentas, hay un mayor espacio de tiempo durante el cual se produce la entrada en exceso de solutos (Henry et al., 1993). Así, cuando se descongela de forma rápida no da tiempo a que la abundancia de solutos salga fuera de la célula, entrando de forma masiva agua al interior de la misma cuando se produce la fusión del hielo por el aumento de la temperatura.

1.3.2. Factores no dependientes de la técnica de criopreservación

Como se ha expuesto en el apartado anterior, la metodología empleada para la criopreservación de los espermatozoides influye directamente sobre el porcentaje de viabilidad espermática obtenido después de realizar este

proceso. Sin embargo, también existen características que afectan a la resistencia a la congelación de las células espermáticas y que no dependen de la técnica de congelación. De este modo, se ha observado que el origen de los gametos, la época del año en la que se obtienen los mismos y el componente genético afectan a la congelabilidad de los espermatozoides.

1.3.2.1. Origen de los gametos

Los gametos que se van a conservar pueden provenir del testículo, epidídimo o eyaculado. Los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo y del eyaculado son maduros y han adquirido ya determinadas características imprescindibles para fertilizar los ovocitos (Cooper, 1999; Millette, 1999). Por otra parte, los espermatozoides procedentes del testículo son inmaduros, aunque pueden congelarse y utilizarse posteriormente por medio del empleo de determinadas técnicas de reproducción asistida más avanzadas como, la inyección intracitoplasmática.

En algunas especies, se ha demostrado una mayor calidad de los espermatozoides descongelados obtenidos del epidídimo frente a aquellos obtenidos del eyaculado en función de determinadas pruebas in vitro (Rath y Niemann, 1997; Blash et al., 2000). Estas diferencias pueden ser debidas a un diferente grado de maduración de los espermatozoides según el origen de los mismos. Sin embargo, también hay que tener en cuenta las diferencias morfológicas encontradas entre las células espermáticas procedentes del epidídimo y del eyaculado y que pueden afectar a la resistencia a la congelación de las mismas. De este modo, se ha observado que los espermatozoides eyaculados presentan una mayor proporción de anomalías en la cola debido posiblemente a cambios osmóticos que ocurren cuando los mismos se mezclan con el plasma seminal (Axner et al., 1998). Además, aunque el plasma seminal contiene muchos componentes

que son beneficiosos para los espermatozoides y que completan el proceso de maduración, el contacto de esta sustancia con las células espermáticas puede tener un efecto tóxico sobre los mismos (Holt, 2000b). Por otra parte, se ha reportado un efecto negativo de la adicción de secreciones de las glándulas accesorias a espermatozoides epididimarios (Way et al., 2002). A pesar de ello, existen trabajos en los que no se han encontrado diferencias entre la resistencia a la congelación de espermatozoides eyaculados y de epidídimo, demostrando que la crioresistencia de los espermatozoides está determinada antes de la eyaculación (Braun et al., 1994).

Con respecto a la congelación de espermatozoides de origen testicular existen autores que no han encontrado diferencias significativas con respecto al porcentaje de gestaciones entre espermatozoides congelados de origen testicular o epididimario (Friedler et al., 2002; Schwarzer et al., 2003). Sin embargo, en otros estudios se ha puesto de manifiesto una superioridad en el porcentaje de fertilización de los espermatozoides epididimarios con respecto a los testiculares (Wood et al., 2002). No obstante, los espermatozoides testiculares parecen bastante resistentes al proceso de congelación puesto que los porcentajes de fertilización son similares para las células espermáticas frescas y congeladas (Fukunaga et al., 2001; Windt et al., 2002).

Estas diferencias en la resistencia a la congelación para muestras espermáticas con un origen diferente pueden deberse a la distinta composición de las membranas del espermatozoide según la procedencia de los mismos (Quinn y White, 1967).

1.3.2.2. Fotoperiodo

En varias especies se ha observado que existen diferencias con respecto a la resistencia a la congelación dependiendo de la época del año en la que se congelan las células espermáticas. Mediante pruebas *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado una mayor calidad del semen congelado en la época reproductiva favorable en especies estacionales. Los principales trabajos se han desarrollado en ovino (Colas y Brice, 1976; Colas, 1979; Fiser y Fairfull, 1983; 1986). Este efecto no se sabe si es debido a la composición del plasma seminal que varía con la estación o a la propia célula espermática. Las proteínas aisladas del plasma seminal durante la época reproductiva son capaces de revertir el daño producido a los espermatozoides tras un choque térmico, independientemente de si los espermatozoides son obtenidos durante la época reproductiva o fuera de ella (Barrios et al., 2001). Sin embargo, otros autores han determinado que la resistencia a la congelación depende más de la composición de la célula que de la del plasma seminal (Graham, 1994).

Por otra parte, cuando las especies no presentan una estacionalidad muy marcada no se observan diferencias con respecto a la resistencia a la congelación para el semen criopreservado en diferentes estaciones (Aguado et al., 1994).

1.3.2.3. Componente genético

Aunque los espermatozoides de diferentes especies han sido congelados con éxito a lo largo de los años, los de otras han mostrado muchos problemas, desconociéndose las razones por las cuales en esas especies la congelación de las células espermáticas no reporta buenos resultados (Leibo y Bradley, 1999). Características determinadas genéticamente como

la forma de los espermatozoides o la composición de la membrana pueden ser las responsables de estas diferencias entre especies con respecto a la resistencia a la congelación (Watson et al, 1992; Thurston et al.,2002a, b).

Las diferencias de forma de tamaño en las células espermáticas pueden establecer el volumen máximo que pueden llegar a tener las mismas. De este modo, los espermatozoides de ave por la forma que tienen son capaces de adoptar una configuración esférica y por lo tanto acomodar los cambios de volumen más fácilmente sin que se rompa la membrana (Watson et al., 1992).

Por otra parte, la resistencia a la congelación de los espermatozoides de diferentes especies también puede estar definida por la composición de la membrana. Los fosfolípidos constituyen los lípidos más abundantes de la membrana. De este modo, es posible que la diferencia en la concentración de fosfolípidos pueda ser la responsable de la resistencia al choque frío en las distintas especies. Por otra parte, la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados también influye en la resistencia al choque frío. En función de esta proporción las especies se clasifican en 2 grupos. Un grupo en el que la relación es de 2,5 a 3 y en esta clase tenemos a los espermatozoides de toro, morueco y cerdo. Otro grupo en el que la relación es de 1 y en esta clase se encuentran los espermatozoides de conejo, perro, hombre y gallo (White, 1993). El primer grupo es mucho más susceptible que el segundo al choque frío. Por otra parte, el contenido en colesterol es importante para determinar la sensibilidad de los espermatozoides al proceso de congelación. Las especies sensibles al choque frío (bovino y ovino) tienen una menor cantidad de colesterol que aquellas especies más resistentes (conejo y hombre) (Darin-Bennet y White, 1977). Finalmente, el contenido proteico también influye en la resistencia al enfriamiento de modo que los espermatozoides de las especies más sensibles como la porcina son los que mayor cantidad de proteínas tienen en la membrana y los de gallo, que son más resistentes,

poseen un menor contenido proteico (Parks y Lynch, 1992). Durante la fase de transición puede ocurrir que las proteínas se agreguen de forma defectuosa a los lípidos. Así, los defectos estructurales en la membrana pueden aumentar con un contenido proteico alto y alterar la permeabilidad de la misma (Watson y Plummer, 1985)

La causa exacta de las diferencias en la resistencia a la congelación entre especies es difícil de determinar puesto que las características de los espermatozoides son diferentes. Sin embargo, entre individuos de la misma especie se ha observado que también existen diferencias con respecto a la crioresistencia de los espermatozoides. Medrano et al. (2002) ha sugerido que estas diferencias entre individuos no se deben al azar, puesto que aquellos animales cuyo semen congela bien tienen esta tendencia de forma repetida y lo mismo para los animales cuyo semen congela mal. Todo ello hace suponer que características determinadas genéticamente en cada individuo son las responsables de las diferencias en la resistencia a la congelación. Así, determinados autores han encontrado una relación entre marcadores de ADN y la resistencia a la congelación para distintos individuos. Estos marcadores se relacionan con ciertas características seminales tras la descongelación (Thurston et al., 2002b). Por último, también se ha demostrado la existencia de determinadas subpoblaciones de espermatozoides en función de una característica determinada dentro del eyaculado de un animal. Estas subpoblaciones presentan diferencias con respecto a la resistencia a la congelación (Abaigar et al., 1999; Abaigar et al., 2001; Quintero et al., 2002). Además, estas subpoblaciones se mantienen constantes para diferentes eyaculados del mismo individuo, lo que confirma una vez más que las diferencias en la congelación espermática entre machos de una misma especie no se deben al azar (Thurston et al., 1999 y Thurston et al., 2001).

Por otra parte, trabajos realizados en diferentes estirpes de ratones ponen de manifiesto que aquéllas más consanguíneas presentan problemas para

congelar de forma idónea el material seminal puesto que los espermatozoides no resisten dicho proceso (Nakagata y Takeshima, 1993; Songsasen y Leibo, 1997; Sztejn et al., 2000). Del mismo modo, en tres especies de gacela con diferentes niveles de consanguinidad, se ha observado que la especie con peores tasas de resistencia a la congelación espermática es aquella con un mayor nivel de consanguinidad (Garde et al., 2003).

Por último, los espermatozoides de animales teratoespérmicos o de hombres infértiles siempre congelan mal por lo que se puede suponer que algunas características determinadas genéticamente sean las responsables de la menor resistencia a la congelación (Mossad et al., 1994; Hammadeh et al., 1999; Pukazhenthil et al., 2000; Hammadeh et al., 2001; Pukazhenthil et al., 2002).

2. MÉTODOS EMPLEADOS PARA VALORAR LA CALIDAD SEMINAL

Las pruebas seminales de contrastación seminal in vitro se han desarrollado para evaluar la calidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Mortimer, 1994). Se entiende por calidad seminal, el conjunto de parámetros que caracterizan a las células espermáticas y definen el grado de viabilidad de las mismas (Larsson, 1986). Los espermatozoides para llevar a cabo la fecundación del ovocito deben presentar diversas propiedades como la movilidad, la capacidad de experimentar la reacción acrosómica y la capacidad de unión al ovocito y penetración de la zona pelúcida (Berger, 1996). Para ello, las células espermáticas tienen que mostrarse íntegras desde un punto de vista morfológico y funcional. De este modo, existen diferentes test in vitro que evalúan desde la producción espermática, hasta las características morfológicas y fisiológicas de los espermatozoides (Check et al., 2002). Sin embargo, casi ninguna de estas pruebas de forma aislada se correlaciona

significativamente con la fertilidad in vivo (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000). Por tanto, cuanto más parámetros espermáticos in vitro se determinen más precisa será la valoración de la calidad de las muestras (Amann y Hammersttdt, 1993).

Por otra parte, tras la criopreservación resulta esencial evaluar la calidad seminal mediante diferentes pruebas, puesto que durante el proceso de congelación-descongelación se reduce notablemente la misma, por lo que cualquier muestra que vaya a ser utilizada para inseminación deberá poseer unas cualidades seminales aceptables para poder llevar a cabo con éxito la fecundación del ovocito.

2.1. Determinación de la concentración espermática

El estudio de la concentración espermática resulta de gran importancia tanto desde un punto de vista andrológico como para poder aplicar determinadas técnicas de reproducción asistida. Así, uno de los factores responsables de la baja fertilidad del semen congelado es el bajo número de espermatozoides viables por dosis espermática (Salomon y Maxwell, 1995b; Watson, 2000). La concentración puede ser determinada mediante hemocitómetros y espectrofotómetros (Amann, 1981; Mortimer, 1994). Además, existen métodos automáticos más sofisticados como son los contadores de partículas y los sistemas computerizados (Amann, 1981).

2.2. Análisis de la movilidad espermática

Una de las pruebas más frecuentemente utilizada para valorar la calidad seminal es el análisis de la movilidad espermática (Amann, 1981). La movilidad espermática es un indicativo de viabilidad celular tanto desde un punto de vista de integridad de membrana como de funcionalidad del

metabolismo celular. Esta característica del espermatozoide es necesaria para que dichas células recorran el tracto reproductor femenino hasta llegar al lugar donde ocurre la fecundación (Amann, 1989; Amann y Hammerstdt, 1993).

La evaluación de la movilidad del espermatozoide se puede realizar de forma subjetiva a partir de una muestra espermática sin diluir o bien diluida. En el primer caso, se estiman los movimientos de la masa espermática de un eyaculado (Evans y Maxwell, 1989; Baril et al., 1993). La valoración se realiza en una escala del 0 (no movimiento) al 5 (movimiento vigoroso) en función del tipo de ondas. En el segundo caso, tras la dilución de la muestra espermática se estima la movilidad individual de los espermatozoides, lo cual se expresa en porcentaje. Además, sobre la misma muestra se puede valorar la calidad del movimiento en una escala que oscila de 0 a 5 (Evans y Maxwell, 1989; Baril et al., 1993).

Sin embargo, la valoración subjetiva de la movilidad del espermatozoide puede estar sujeta a variaciones entre los observadores (Amann, 1981). Además, mediante esta técnica es imposible determinar la velocidad real del espermatozoide, así como su movimiento y trayectoria. Por ello, en los últimos años se están utilizando métodos de evaluación objetiva de la movilidad como aquellos basados en métodos fotográficos y de videomicrografía y analizadores de imágenes computerizadas que determinan una gran variedad de parámetros relacionados con el movimiento espermático (Blanco, 1998; Rasul et al., 2001). De este modo, algunos autores han utilizado estos parámetros de movilidad determinados de forma objetiva como índices de crioresistencia (Fernades et al., 1990; McLaughlin et al., 1992; Russell et al., 1995). Del mismo modo, utilizando estas técnicas de valoración de la movilidad de forma objetiva y con los análisis estadísticos apropiados se puede estudiar la presencia de distintas subpoblaciones de espermatozoides en un eyaculado con diferentes

características de movimiento (Abaigar et al., 1999, 2001; Quintero-Moreno et al., 2002).

2.3. Análisis de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática

La membrana espermática es la estructura del espermatozoide donde ocurren los principales daños celulares debidos a los procesos de congelación. Existen diferentes métodos para evaluar la integridad de la misma. Los más utilizados son los colorantes vitales no fluorescentes que determinan el porcentaje de espermatozoides vivos. De este modo, si las membranas están rotas o dañadas el colorante penetra en el interior de la célula y ésta aparece teñida. Existen diferentes tinciones para evaluar la integridad de la membrana entre las que se encuentran la eosina-nigrosina y el tripan azul (Garde et al., 1992; Tamuli y Watson, 1994; Garde et al., 1997a). Por otra parte, las tinciones fluorescentes también han sido empleadas para valorar la integridad de la membrana (Harrison y Vickers, 1990; de Leeuw et al., 1991; Garner et al., 1997; Naitana et al., 1997). Entre los colorantes utilizados se encuentran el Hoescht 33258, carboxyfluoresceina diacetato, SYBR14 y el yoduro de propidio, los cuales penetran en la célula cuando la membrana plasmática está rota coloreando el interior del espermatozoide. El principio de actuación se basa en que estas sustancias al penetrar en los espermatozoides se unen a los ácidos nucleicos e inducen una intensa fluorescencia visible mediante microscopios de fluorescencia.

Por otra parte, para evaluar la funcionalidad de la membrana se utiliza el test hipoosmótico. Jeyendran et al. (1984) desarrollaron esta técnica que permite estudiar como responden los espermatozoides al someterlos a soluciones hipoosmóticas. De este modo, si la membrana es funcional permite el paso de agua a través de la misma para recuperar el equilibrio

osmótico y como consecuencia del aumento del volumen las membranas espermáticas se expanden adquiriendo los espermatozoides una morfología más esférica y dando lugar a una forma típica con la cola “hinchada” (Drevius y Eriksson, 1966). La funcionalidad de la membrana es imprescindible durante los procesos de fecundación. De este modo, diversos autores han demostrado una correlación entre la funcionalidad de la membrana determinada mediante el test hipoosmótico y la fertilidad in vivo e in vitro en determinadas especies de animales (Van der ven et al., 1986; Neild et al., 2000; Pérez-Llano et al., 2001).

Por otra parte, la evaluación de la funcionalidad de la membrana mediante esta prueba puede estar muy relacionada con la resistencia a la congelación puesto que durante este proceso se producen muchos cambios en el volumen celular, siendo necesaria una membrana plasmática íntegra para resistir el tratamiento completo de criopreservación. De este modo, se ha determinado que las especies cuyos espermatozoides tienen una mayor resistencia a la congelación también resisten mucho mejor un estrés osmótico provocado por la eliminación rápida en un solo paso de glicerol (Garde et al., 2003).

Por último, cuando la membrana espermática se daña por la congelación se produce una pérdida de determinadas enzimas presentes en el citoplasma del espermatozoide. De este modo, enzimas como la LDH o la alanina transaminasa pueden servir como marcadores de daño de la membrana plasmática debido al proceso de criopreservación (Upreti et al., 1996).

2.4. Análisis de la integridad de la membrana acrosomal

El acrosoma es una estructura situada en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide en cuyo interior se encuentran almacenadas enzimas

hidrolíticas que son imprescindibles para que las células espermáticas atraviesen las distintas envolturas del ovocito (Millette, 1999). Esta estructura está rodeada por una membrana acrosomal cuya cara externa está en estrecha relación con la membrana plasmática. Por ello, el acrosoma es una parte del espermatozoide que es susceptible de ser dañada durante la congelación. De este modo, se ha demostrado que tras el proceso de criopreservación los espermatozoides se encuentran en un estado similar al de capacitación (Garde, 1993), debido a la desestabilización que han sufrido las membranas, siendo más susceptibles de experimentar una reacción acrosómica prematura acortándose como consecuencia de lo anterior la longevidad de los mismos (Watson, 1995).

La integridad morfológica del acrosoma puede ser evaluada de diferentes maneras. Una de las técnicas más sencillas consiste en fijar las muestras espermáticas en una solución de glutaraldehído o formaldehído y observarlas mediante microscopía de contraste de fases (Pursel y Jonson, 1974; Shams-Borham y Harrison, 1981; Pontbriand et al., 1989). Por otra parte, la morfología del acrosoma puede ser evaluada mediante diferentes tinciones como la de giemsa o azul de comasi (Watson y Martín, 1972; Larson y Miller, 1999) o mediante otro tipo de tinciones más elaboradas, como la triple tinción en las que además de la integridad del acrosoma también se valora la de la membrana plasmática, pudiendo diferenciar entre espermatozoides vivos y muertos y con presencia o ausencia de acrosoma (Talbot y Chacon, 1981; Garde et al., 1992; Garde et al., 1997a). Otros métodos de evaluación consisten en el empleo de lecitinas marcadas con fluorocromos, pudiendose determinar la integridad del acrosoma con estas técnicas (Way et al., 1994; Varcárcel et al., 1997). Por último, mediante la utilización de clortetraciclina marcada con fluorescencia se puede discriminar el estado en el que se encuentra el acrosoma. Así, se puede diferenciar si el espermatozoide se encuentra con el acrosoma intacto, capacitado o reaccionado (Fraser, 1995; Pérez et al., 1996).

2.5. Evaluación de la morfología espermática

La evaluación de la morfología resulta de gran utilidad para predecir la fertilidad tanto in vivo como in vitro (Ombelet et al., 1995; Hirai et al., 2001). En la especie humana existen diferentes clasificaciones para determinar la morfología de los espermatozoides, además de valores umbrales a partir de los cuales se considera una muestra espermática como morfológicamente normal y apta para ser utilizada en distintas técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, en las especies domésticas es más difícil encontrar una estandarización de la morfología espermática y muchas veces se utilizan aquellas clasificaciones desarrolladas para espermatozoides de la especie humana. Uno de los principales métodos que se siguen para evaluar la morfología de los espermatozoides de las diferentes especies de animales es aquel desarrollado para la especie humana por Eliasson (1981). Este autor clasifica los defectos de la cabeza, cuello, pieza intermedia y cola de forma separada y expresado como el porcentaje del número total de espermatozoides contados.

Por otra parte, algunos autores han intentado relacionar determinadas características morfológicas con la resistencia a la congelación. De este modo, se ha encontrado una correlación entre la presencia de gota citoplasmática y la movilidad a la descongelación (Nothling et al., 1997).

La morfología espermática puede ser evaluada por medio de tinciones como la de eosina-nigrosina, observando las muestras en campo claro o bien después de fijar las muestras seminales en glutaraldehído, observando las muestras mediante microscopía de contraste de fases. Sin embargo, estas técnicas tienen como principal inconveniente su subjetividad. Por ello, actualmente se han desarrollado programas informáticos que analizan automáticamente las imágenes de los espermatozoides una vez teñidos. Estos métodos informáticos nos permiten determinar características más

precisas de la célula espermática como el área y perímetro de la cabeza del espermatozoide, longitud de la cola, diámetro de la pieza intermedia, etc. Por otra parte, estas técnicas objetivas suelen presentar menos variabilidad que los métodos convencionales (Gravance et al., 1999; Marnet et al., 2000). Además, la evaluación objetiva de la morfología resulta de gran utilidad para predecir la calidad seminal tras la congelación (Gravance et al., 1998; Thurston et al., 2001).

2.6. Inducción de la reacción acrosómica

Para poder efectuar la fecundación, los espermatozoides deben experimentar la reacción acrosómica (Roldán, 1996). Este proceso puede inducirse in vitro mediante una variedad de agonistas fisiológicos (progesterona y zona pelucida) y antibióticos como el ionóforo de calcio A23187. Se ha encontrado que existe una correlación entre la proporción de células que reaccionan al ionóforo de calcio A23187 y la fertilidad in vivo e in vitro (Cummins et al., 1991; Liu y Baker, 1998). Además, también existe una correlación con la supervivencia al proceso de congelación-descongelación (Szász et al., 2000).

2.7. Prueba de resistencia térmica

En animales domésticos se ha observado que existe una buena correlación entre la capacidad de las muestras espermáticas de resistir a un proceso de incubación (midiendo movilidad y acrosomas) con la fertilidad (Salisbury et al., 1961). Por otra parte, un periodo corto de incubación a 42°C correlaciona positivamente con los resultados obtenidos durante incubaciones largas a temperatura corporal (Fiser et al., 1991).

2.8. Otras técnicas de evaluación seminal

Además de las técnicas mencionadas anteriormente, podemos determinar las características físico-químicas del eyaculado o material espermático como el pH y la osmolaridad, permitiendo la caracterización de una muestra seminal y eliminando aquellas que no reúnan los requisitos necesarios. Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se hayan relacionado dichas características con la resistencia a la congelación.

Por otra parte, también se han realizado estudios para relacionar la resistencia a la congelación con determinados marcadores bioquímicos (Royere et al., 1996). De este modo, se ha medido la concentración de diversos componentes en el semen como el sodio, potasio y calcio aunque no se ha encontrado ninguna relación con la congelabilidad (McLaughlin et al., 1992). Otros autores, han determinado la actividad de determinados enzimas cuya presencia en las células espermáticas se encuentra disminuida tras la criopreservación (Alvarez y Storey, 1992; Bilodeau et al., 2000).

Por último, debido a que los métodos utilizados rutinariamente para evaluar la calidad seminal están muy poco relacionados con la fertilidad in vivo, se han desarrollado otras técnicas como la fecundación in vitro (FIV) para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides, puesto que este método correlaciona mejor con la fertilidad in vivo (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000). Estas técnicas también han sido desarrolladas en distintas especies de cérvidos (Comizzoli et al. 2001; Soler y Garde, 2003). No obstante pocos trabajos han estudiado si existe alguna relación entre la resistencia a la congelación y la capacidad de fertilización.

3. CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CIERVO

3.1. Desarrollo tecnológico de la reproducción en cérvidos

El aprovechamiento industrial de las distintas especies de cérvidos así como, el creciente interés en conservar aquellas subespecies en peligro de extinción ha dado lugar a que en los últimos años se hayan realizado estudios de la fisiología reproductiva y desarrollado técnicas de reproducción asistida en estas especies.

Entre las técnicas de reproducción asistida más utilizadas y desarrolladas en cérvidos se encuentra la inseminación artificial (IA), debido a la gran cantidad de ventajas que presenta. Esta técnica junto a las de criopreservación nos permiten la difusión genética de los animales más productivos, utilizándose además, para conservar especies de cérvidos que se encuentran en peligro de extinción. Por otra parte, mediante estas técnicas se pueden introducir nuevos genes en fincas o zoológicos que presentan cercados y en las cuales no puede existir un flujo genético de forma natural. De este modo, se evitan consecuencias tan desastrosas como la consanguinidad. Otra ventaja es que se puede reducir el número de animales, resolviendo problemas de espacio como por ejemplo en zoológicos, puesto que podemos disponer de material genético criopreservado de forma indefinida (Wildt et al., 1993; Johnston y Lacy, 1995).

Sin embargo, la IA cuenta con una serie de limitaciones. Una de las principales desventajas es la relacionada con la estacionalidad de estas especies la cual condiciona enormemente el momento óptimo de la inseminación artificial. Del mismo modo, también representa un problema para la obtención de los gametos (Asher et al., 1999). Los machos de las

especies de cérvidos estacionales presentan cambios en el tamaño de los testículos dando lugar a periodos alternos de fertilidad e infertilidad (Lincoln, 1971a; Mirachi et al., 1977; Haig et al., 1984; Gosh y Fischer, 1989; Asher et al., 1996). Estos cambios en el tamaño de los testículos van asociados a diferencias en la calidad seminal en función de la estación, de modo que en verano la producción de gametos es nula y debido a ello se limita el periodo en el cual se pueden obtener espermatozoides (Asher et al., 2000). Todo este procedimiento se encuentra todavía más limitado por la estacionalidad que exhiben las hembras en relación al momento óptimo para llevar a cabo la inseminación artificial (IA).

Otras técnicas de reproducción asistida que están siendo utilizadas actualmente para mejorar el rendimiento reproductivo de los ciervos son la transferencia de embriones y la producción de embriones in vitro. La transferencia de embriones ha sido desarrollada principalmente para algunas especies determinadas de ciervo por Fennessy et al. (1994). Del mismo modo, Comizzoli et al. (2000) han obtenido embriones in vitro de ciervo rojo y de ciervo japonés.

3.2. Métodos de obtención de las células espermáticas

El método ideal para la obtención de las muestras espermáticas no debe implicar riesgos físicos para los animales vivos ni para el personal encargado de realizar la extracción seminal. Además, el semen obtenido tiene que tener una composición química y física normal (Watson, 1978).

Los métodos de recogida seminal usados en los cérvidos se dividen en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellos en los que el semen se recoge provocando o estimulando la eyaculación de los machos, incluyéndose en este grupo la obtención mediante vagina artificial y la

electroeyaculación y por otro lado, están aquellos en los que la muestra espermática se obtiene sin producirse la eyaculación de los machos, encontrándose dentro de estos la recuperación post-mortem de las células espermáticas procedentes del epidídimo.

3.2.1. Vagina artificial

El desarrollo de este método de recogida seminal se debe principalmente a los estudios llevados a cabo por investigadores polacos (Dott y Utsi, 1971; Krzywinski, 1976; Krzywinski y Jaczewski, 1978; Strzezek et al., 1985). A pesar de que los eyaculados recogidos mediante esta técnica son de gran calidad y no existen riesgos para los machos, otro tipo de problemas no la hace la técnica de elección para recoger semen en estas especies. Entre las desventajas de esta técnica, cabe destacar que los animales que se someten a este tipo de recogida seminal requieren un alto nivel de habituamiento y entrenamiento. Además, debido al comportamiento agresivo que presentan estas especies durante la berrea, actualmente es un método muy poco utilizado (Asher et al., 1993). Debido a todos estos inconvenientes esta técnica de recogida seminal se reserva principalmente para animales que tienen un gran valor genético (Asher, 1998).

3.2.2. Electroeyaculación

La mayoría de las recogidas de semen en cérvidos se realiza mediante electroeyaculación con los animales anestesiados (Asher et al., 1993). El principal inconveniente de esta técnica es el riesgo que soportan los animales como consecuencia de la anestesia a la que se someten. Sin embargo, no precisa machos que estén entrenados pudiendo obtenerse semen de cualquier ciervo. Por otra parte, es un método más seguro para los operarios.

Los eyaculados naturales se han considerado con una mejor calidad seminal que los obtenidos mediante electroeyaculación. Sin embargo, esta afirmación nunca ha sido demostrada en el ciervo (Asher et al., 2000). Además, en el ciervo ibérico se han obtenido mediante electroeyaculación muestras seminales con una calidad óptima (Anel et al., 1999; Garde et al., 1999b).

3.2.3. Recogida epididimaria post-mortem

La obtención de las células espermáticas del epidídimo después de la muerte de los venados supone una gran ventaja desde un punto de vista conservacionista y productivo. Las células espermáticas almacenadas en este órgano son funcionalmente maduras y con la misma capacidad fecundante que las que proceden del eyaculado (Robaire y Hermo, 1998; Cooper, 1999). Para obtener los espermatozoides de la cola del epidídimo se han utilizado diferentes metodologías en cérvidos (Krzywinski, 1981; Platz et al., 1982; Miles et al., 1992; Garde et al., 1996; Zomborszky et al., 1999).

El principal inconveniente de esta técnica es el número reducido de dosis espermáticas que se obtienen de los epidídimos. Así mismo, resulta imposible el estudio continuo de determinadas características sobre el mismo animal. Por otra parte, la calidad seminal puede disminuir como consecuencia del tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la recogida de los espermatozoides. En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha reportado que la calidad seminal y la capacidad fecundante de los espermatozoides obtenidos del epidídimo y conservados a temperatura ambiente disminuye cuando los animales llevan muertos más de 12 horas (Garde et al., 1998; Soler y Garde, 2003). A pesar de ello, se ha demostrado que los espermatozoides obtenidos hasta 24 horas después de la muerte son capaces de penetrar in vitro ovocitos de hámster libres de

zona pelúcida (Garde et al., 1996; Soler y Garde, 2003). Por otra parte, con temperaturas más bajas la calidad seminal se conserva durante más tiempo (Friedmann et al., 1999; Kaabi et al., 1999; Kaabi et al., 2003). En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que para los espermatozoides procedentes de testículos de ciervo ibérico conservados a 5°C, la calidad seminal evaluada mediante pruebas in vitro se mantiene hasta 4 días (Soler et al., 2003a).

3.3. Preservación de espermatozoides de ciervos

Una variedad de técnicas de conservación de espermatozoides se han desarrollado para su utilización en diferentes especies de ciervos. Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se hayan comparado diferentes diluyentes y métodos para preservar los espermatozoides de estas especies. Muchos de los diluyentes utilizados con éxito en los cérvidos han sido adaptados de los que comúnmente se emplean para pequeños rumiantes. La causa de que el estudio de los procedimientos de preservación en semen de ciervos sea escaso, puede ser debida a la alta eficacia de las técnicas que han sido desarrolladas para otros rumiantes y que actualmente se utilizan en este tipo de ungulados. A pesar de ello, algunos investigadores han determinado el mejor diluyente o la mejor técnica de congelación para conservar las células espermáticas procedentes de ciervos. Estos trabajos resultan de gran interés e imprescindibles puesto que, incluso para especies muy relacionadas existen diferencias en la resistencia a la congelación.

3.3.1. Diluyentes utilizados para la congelación de espermatozoides de ciervo

La mayoría de los diluyentes utilizados para congelar semen de ciervo han sido adaptados de aquellos utilizados en otros rumiantes. Así, uno de los primeros intentos de congelar semen de cérvidos, fue realizado por Jaczewski et al. (1976) que emplearon como diluyentes aquellos diseñados para congelar semen de toro y macho cabrío (Corteel, 1975). Posteriormente, varios diluyentes han sido empleados para criopreservar espermatozoides de ciervo, obteniéndose resultados variables de supervivencia espermática (Graham et al., 1978; Krzywinski y Jaczewski, 1978; Platz et al., 1982; Haigh, 1984; Krzywinski et al., 1987; Jacobson et al., 1989; Veldhuizen, 1994; Ortiz, 1999). Algunos de estos diluyentes se describen en la Tabla 1. Por otra parte, aunque en nuestro país es más frecuente utilizar el semen de ciervo congelado, en otros países como Nueva Zelanda es ampliamente común la utilización de semen refrigerado y conservado a 15°C hasta la inseminación artificial. Esta práctica se suele realizar cuando los sementales están localizados en la misma zona donde se llevará a cabo la inseminación artificial. En estos casos, el diluyente no suele contener crioprotectores, manteniéndose el semen a una temperatura de 15°C después de un enfriamiento lento desde temperatura ambiente (Asher et al., 2000).

A pesar de la amplia variedad de diluyentes utilizados para congelar semen de ciervo, se han llevado a cabo muy pocos estudios comparativos encaminados a evaluar de forma objetiva el efecto protector de los distintos medios sobre las células espermáticas sometidas a un proceso de congelación-descongelación. No obstante, existen algunos trabajos en los que se ha investigado la elección del mejor diluyente para criopreservar espermatozoides de una especie de ciervo particular (Haigh et al., 1986; Jacobson et al., 1989; Haigh et al., 1993; Veldhuizen, 1994). Igualmente para el ciervo ibérico se ha estudiado el efecto de diversos diluyentes sobre

la viabilidad espermática a la descongelación, obteniendo que la acción protectora del diluyente depende de la calidad inicial de las muestras (Ortiz, 1999). Así, para las muestras con calidad seminal alta el mejor diluyente es un Tris-citrato con lactosa, mientras que para las de baja calidad es el diluyente comercial Triladyl.

En la mayoría de los diluyentes el crioprotector penetrante más utilizado para congelar semen de ciervo ha sido el glicerol. Esta sustancia puede añadirse al diluyente en un solo paso, de manera que el glicerol se incorpora al diluyente desde el inicio del proceso (Asher et al., 1988; Mulley et al., 1988; Haigh y Bowen, 1991; Jabbour et al., 1993). Otra posibilidad es realizar la dilución de la muestra en dos pasos y en la segunda dilución incorporar el glicerol (Haigh, 1984; Jacobson et al., 1989, Fennessy et al., 1990; Monfort et al., 1993). Por otra parte, el crioprotector no penetrante más utilizado en los diluyentes para congelar semen de ciervo es la yema de huevo, siendo la concentración más habitualmente empleada la del 20%.

3.3.2. Tratamiento del semen de ciervo para su criopreservación

Al igual que ocurre para los diluyentes, existen muy pocos trabajos en los que se haya estudiado de forma comparativa la mejor técnica de congelación para el semen de ciervo. Así, se han empleado velocidades de refrigeración para disminuir la temperatura a 5°C que han oscilado entre 0,12 y 0,35 °C/min (Haigh, 1984; Mulley et al., 1988; Fennessy et al., 1990; Monfort et al., 1993). Por otro lado, los periodos de equilibración a 5°C empleados han variado entre 2 y 5 horas (Krzywinski, 1981; Haigh et al., 1993).

Por otra parte, la velocidad de congelación más ampliamente utilizada para criopreservar semen de ciervo ha sido de 0,10°C/min (Haigh et al., 1985; Jacobson et al., 1989; Fennessy et al., 1990; Monfort et al., 1993). Además, las temperaturas empleadas para descongelar las dosis espermáticas han oscilado entre 35-60°C y tiempos que fluctuaban entre 6 y 60 seg (Jacobson et al., 1989; Haigh y Bowen, 1991; Haigh et al., 1993; Monfort et al., 1993; Veldhuizen, 1994; Zomborszky et al., 1999; Garde et al., 2000).

TABLA 1. Diluyentes utilizados para la criopreservación del semen de cérvidos

Referencia	Especie	Método de Obtención	Diluyente	Crioprotector (*)
Jaczewski et al., (1976)	Ciervo rojo	Electroejaculación	Leche descremada	Glicerol (NR)
Krzywinski y Jaczewski (1978)	Ciervo rojo	Vagina artificial	Citrato-Fructosa	Glicerol (NR)
Platz et al., (1982)	Cola blanca	Electroejaculación Post-mortem	11% de lactosa	Glicerol (NR)
Haigh, (1984)	Cola Blanca	Electroejaculación	Leche descremada	Glicerol (2)
Mulley et al., (1988)	Gamo	Electroejaculación	Tris-Glucosa-Cítrico	Glicerol (1)
Asher et al., (1988)	Gamo	Electroejaculación	Citrato de Sodio	Glicerol (1)
Jacobson et al., (1989)	Cola blanca	Electroejaculación	Tris-Citrato	Glicerol (2)
Fennessy et al., (1990)	Ciervo Rojo	Electroejaculación	Citrato-Fructosa	Glicerol (2)
Haigh et al., (1993)	Axis	Electroejaculación	Triladyl®	Glicerol (1)
Monfort et al., (1993)	Ciervo Eld	Electroejaculación	Tes-tris-Fructosa-Glucosa	Glicerol (2)
Argo et al., (1994)	Padre David	Electroejaculación	Citrato de sodio	Glicerol (1)
Ortiz (1999)	Ciervo rojo	Post-mortem	Triladyl®	Glicerol (1)

(*): Sistemática de adición del glicerol

(1): adición del glicerol en una primera y única fracción de diluyente

(2): adición del glicerol en una segunda fracción del diluyente

NR: no reportado

Sin embargo, en el ciervo ibérico se han llevado a cabo estudios comparativos con el objetivo de diseñar la mejor técnica para congelar

espermatozoides obtenidos post-mortem (Ortiz, 1999). Para esta subespecie de cévido la velocidad de enfriamiento (desde temperatura ambiente a 5°C) que menos daño produce a los espermatozoides es de 0,25°C/min, siendo el periodo de equilibración óptimo a 5°C de 120 min antes de que las muestras se congelen sobre vapores de nitrógeno líquido. Por último, con el empleo de velocidades de congelación lentas el daño celular reportado es menor que cuando son rápidas. Por ello, las velocidades de criopreservación que minimizan los daños en los espermatozoides de esta subespecie son las de 12 y 20°C/min.

Con respecto a la velocidad de descongelación, se ha demostrado en diferentes especies de cévidos que las lentas son las que reportan mejores resultados, siendo el protocolo de 37°C durante 10 seg con el que se obtiene una mayor viabilidad celular (Soler et al., 2003c). Estos mismos resultados se han observado en ciervo ibérico (Soler et al., 2003b).

3.4. Aplicación de las técnicas de reproducción asistida en el ciervo ibérico

La especie *Cervus elaphus*, cuya amplia área de distribución abarca Europa, Asia y el norte de África, se divide taxonómicamente en trece subespecies, entre las cuales se encuentra el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Esta subespecie tiene especial interés desde un punto de vista conservacionista puesto que se distribuye exclusivamente por la Península Ibérica. Sin embargo, esta subespecie en los últimos años se está enfrentado a grandes problemas derivados de la gestión de las fincas. Así, en algunas fincas, se ha originado un alto grado de mestizaje de los ejemplares como consecuencia del desarrollo de prácticas de cruzamientos con machos foráneos de otras subespecies de ciervo rojo con un mayor tamaño corporal y de la cornamenta, con objeto de incrementar la calidad de los trofeos. Este hecho puede llegar a poner en peligro la pureza del

ciervo ibérico, el cual, como se ha referido anteriormente, es autóctono de nuestro país.

Por otra parte, la actividad cinegética referida a la caza mayor ha experimentado grandes cambios en España en los últimos años. De hecho, en muchas comunidades autónomas, las fincas de caza mayor han sido cercadas con un vallado perimetral. De esta manera, las especies de caza mayor al representar bienes económicos se han convertido en el objetivo prioritario de la explotación. Como consecuencia de todo lo anterior, la caza, y muy particularmente la referida a las especies cinegéticas mayores, se ha convertido en una actividad con orientación empresarial, considerándose como una inversión rentable la realizada en este tipo de cotos. Además, todo ello se ha traducido en un intenso comercio de animales para repoblaciones, bien sean de granjas especializadas, explotaciones de cría controlada, cotos comerciales, capturaderos, etc. Es decir, que existe una población importante de ciervos, que se crían de forma controlada, y que por tanto puede ser susceptible de manipulaciones con objeto de aumentar la calidad de sus producciones.

De este modo, el manejo de las poblaciones de ciervo, basados principalmente en la utilización de cercados cinegéticos, han planteado nuevas problemáticas y el mayor grado de intervención exige una gestión más rigurosa, basada en el empleo de las nuevas tecnologías. Dentro de este marco, la aplicación de la Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) ha resultado ser de gran interés para la gestión de algunas explotaciones cinegéticas dedicadas a la explotación del venado. Por lo tanto, las TRA pueden ser enorme utilidad para disminuir los niveles de consanguinidad en las fincas valladas así como, para conservar el germoplasma de los ejemplares más interesantes.

Una de las herramientas con las que cuentan las Técnicas de Reproducción Asistida es la criopreservación de los espermatozoides. La creación de un banco de semen cuenta con una serie de ventajas, que para el caso del ciervo ibérico, destacan las siguientes:

- Es una subespecie que sólo existe en España y Portugal y por lo tanto es de sumo interés preservarla. Además, en los últimos años está siendo hibridado con machos de otras subespecies, con lo cual en algunas situaciones su pureza peligra. Por ello, conviene preservar el germoplasma de una gran variedad de individuos puros.
- Las fincas que se encuentran valladas pueden tener altos niveles de consanguinidad como consecuencia de la interrupción natural del flujo genético, por lo cual es necesario la entrada de nuevos genes de la misma subespecie con el fin de aumentar la variabilidad genética.
- El interés principal de la explotación de ciervos en nuestro país es el cinegético, el cual a su vez viene determinado por la calidad de los trofeos de los machos. La conservación de los mejores venados que se abatan cada año, puede ser de gran utilidad para luego introducir la genética de los mismos en las explotaciones de cérvidos de cría controlada, puesto que la cuerna es un carácter heredable (Kruuk et al., 2002).

Por lo expuesto anteriormente, es de gran interés el estudio de los factores que afectan a la congelabilidad de los espermatozoides de ciervo ibérico. Puesto que en estudios previos se ha determinado cual es el mejor protocolo para congelar células espermáticas procedentes de esta subespecie, resulta necesario evaluar otra serie de factores que pueden afectar a la congelabilidad espermática. Entre ellos se encuentran aquellos

relacionados con las características propias del animal, ya que estudios actuales realizados con otras especies han revelado una variabilidad individual con respecto a la resistencia a la congelación de los gametos masculinos. Entre los factores que son intrínsecos al animal y pueden afectar a la resistencia a la congelación de los espermatozoides se encuentran: la edad, el grado de consanguinidad o exogamia, la condición corporal y el grado de estrés. Por otra parte, tampoco se ha estudiado en esta especie que época del año es la mejor para la congelación de las células espermáticas, puesto que estos ungulados presentan una estacionalidad reproductiva muy marcada (García et al., 2002) y el momento en el que se recogen las muestras espermáticas puede afectar a la congelabilidad. Por último, debido a que muchas veces se tiene que congelar el material espermático de animales con un alto valor desde un punto de vista productivo o conservacionista, independientemente de la calidad seminal inicial de la que partan las muestras, es necesario conocer que parámetros de calidad seminal evaluados mediante diferentes test son los que más se relacionan con la resistencia a la congelación de los espermatozoides.

El logro en estos tres puntos permitiría poder predecir la resistencia a la congelación de los gametos masculinos y por lo tanto en función de la congelabilidad de las mismos utilizar la técnica de reproducción asistida más idónea.

OBJETIVOS

La explotación de especies de interés cinegético como el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) ha empezando a alcanzar un cierto nivel de desarrollo tecnológico en los últimos años. El conocimiento cada vez más profundo de la biología de la especie y el desarrollo de tecnologías reproductivas han permitido la obtención de ciervos por medio de IA a partir de antecesores de gran valor genético y económico. No obstante, a pesar del trabajo realizado en el campo de la reproducción, una de las tecnologías utilizadas en el mismo, como la criopreservación seminal no ha alcanzado aún su máximo desarrollo en esta especie, permaneciendo numerosos interrogantes sin resolver.

En esta especie se han realizado estudios para conocer cual es el mejor protocolo de congelación que hay que aplicar para conseguir el mayor porcentaje de células espermáticas viables después de la congelación. Sin embargo, existen otros factores que influyen sobre la congelabilidad de los espermatozoides y que todavía no se han estudiado.

Para este tipo de ungulado hay que tener en cuenta que muchas veces es imprescindible congelar el material espermático por el valor del animal, independientemente de la calidad seminal inicial que posea. Por lo tanto, sería de gran utilidad conocer que parámetros de calidad seminal evaluados mediante diferentes test in vitro se relacionan con la resistencia a la congelación.

Por otra parte, existen determinados factores, como el mes en el que se recogen las muestras espermáticas, la edad, la variabilidad genética, la condición corporal o el grado de estrés que alteran las características indicativas de calidad seminal evaluadas in vitro. Estos factores pueden del mismo modo afectar a la resistencia a la congelación y por lo tanto que haya que tenerlos en cuenta al aplicar un protocolo de congelación de células espermáticas procedentes de ciervo ibérico.

Por todo ello, los objetivos que nos proponemos con la realización del presente estudio son:

- Evaluar si a partir de determinados parámetros de calidad seminal evaluados en diferentes momentos (inicial, después de la descongelación y tras una incubación a 37°C durante 2 horas) y mediante diferentes test in vitro, se puede predecir la resistencia a la congelación de las muestras espermáticas. Igualmente, estudiar si mediante determinadas pruebas de estrés, como la prueba de resistencia térmica y la inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio se puede predecir la resistencia a la congelación de las muestras espermáticas.

- Analizar el efecto del mes en el que se obtienen las gónadas de los animales sobre la resistencia a la congelación de las muestras espermáticas de los mismos. Igualmente, evaluar el efecto que ejercen los parámetros intrínsecos al macho: edad, variabilidad genética condición corporal y grado de estrés sobre la resistencia a la congelación de las muestras espermáticas de dichos machos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. GAMETOS

Los espermatozoides empleados en esta tesis han procedido de los epidídimos de los testículos de 240 ciervos ibéricos (*Cervus elaphus hispanicus*) abatidos en su hábitat natural durante los meses de octubre a febrero de las temporadas de caza de 1999/00 (n=50), 2000/01 (n=158), 2001/02 (n=32) en diferentes fincas de caza (n=15) ubicadas en las provincias de Badajoz (n=7), Ciudad Real (n=114), Córdoba (n=21), Jaén (n=66) y Toledo (n=32). La edad de los venados osciló entre 2 y 15 años, estando el 81% de los animales en el rango de edades comprendido entre 3 y 10 años.

Para la obtención de los testículos, las gónadas fueron separadas del cuerpo de los animales a partir de una incisión realizada a nivel inguinal. Los testículos se transportaron envueltos en el escroto, a temperatura ambiente en el interior de bolsas de plástico hasta el laboratorio de Reproducción Animal de la ETSIA de Albacete. El intervalo de tiempo transcurrido desde la recogida de los testículos hasta la llegada al laboratorio osciló entre 2 y 6 horas (Figura 1).

Una vez en el laboratorio se procedió a la obtención del material espermático. La extracción de los espermatozoides se realizó a temperatura ambiente. Para ello, se separaron mediante material quirúrgico todas las envolturas testiculares que recubren al testículo y al epidídimo (Figura 1). Dichas estructuras son de fuera hacia dentro: la piel y el tejido subcutáneo, la fascia espermática externa, la cremastérica interna, la túnica vaginal y la túnica albugínea. Posteriormente, se procedió a realizar diversas incisiones con una hoja de bisturí sobre la cola del epidídimo y con esta misma hoja se arrastró el material espermático que se depositó en una placa de Petri en la que se había depositado previamente 1 ml de solución tampon fosfato salino (PBS) (Anexos) (Figura 2). El contenido espermático

de ambos testículos se diluyó en el PBS, puesto que se ha demostrado que no existen diferencias de calidad seminal para ambos testículos (Garde et al., 1998). Tras ello se transvasó la suspensión espermática a un tubo colector graduado (Figura 2) e inmediatamente se midieron el volumen y la concentración. Del tubo colector se utilizaron 0,5 ml para en el proceso de congelación. El resto se utilizó para la contrastación de la calidad seminal inicial y para las pruebas de inducción de la reacción acrosómica in vitro y la de resistencia térmica.

2. ANÁLISIS DE CALIDAD SEMINAL

Los parámetros que se utilizaron para evaluar la calidad seminal fueron aquellos que miden características relacionados con la movilidad espermática (porcentaje de movilidad individual y calidad del movimiento), con la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática (viabilidad espermática y pruebas de endósmosis celular), con el estado del acrosoma y la morfología espermática. Del mismo modo, se evaluaron características cuantitativas como el volumen y la concentración.

2.1. Volumen

El volumen (V) se midió por apreciación visual en el tubo graduado después de transvasar el material espermático procedente de la placa de Petri.

2.2. Concentración espermática

La concentración espermática (C) se determinó mediante el empleo de la cámara de Bürker siguiendo las indicaciones de Evans y Maxwell (1989).

Para ello se diluyeron 5 μ l de la suspensión espermática en 1000 μ l de agua para así producir la muerte de los espermatozoides. Se contaron 20 cuadrículas de volumen conocido y se determinó el número medio de espermatozoides presentes en estas cuadrículas. Teniendo en cuenta el volumen de la cuadrícula y la dilución realizada se obtuvo el número de espermatozoides por mililitro de suspensión espermática.

2.3. Número total de espermatozoides

El número total de espermatozoides (NTE) se obtuvo multiplicando el volumen por la concentración.

2.4. Movilidad espermática

De la suspensión espermática inicial (suspensión I) se utilizaron 20 μ l que se diluyeron en 500 μ l de PBS y esta nueva suspensión (suspensión II) se incubó durante 10 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se evaluó el porcentaje de espermatozoides móviles (MI), colocando 5 μ l de la suspensión II en un portaobjetos sobre una placa térmica (Minitub, HT 400) a 37°C y observando diferentes campos en un microscopio óptico (Nikon, Eclipse 400) a 10x y en contraste de fases. Sobre la misma muestra se evaluó la calidad del movimiento (CM) en una escala de 0 (acinesis) a 5 (movimiento muy rápido).

2.5. Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática

2.5.1. Viabilidad espermática

La suspensión II se utilizó para evaluar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante una tinción con eosina-nigrosina preparada según ha sido descrito por Tamuli y Watson (1994). Para ello, se mezclaron 5 μ l de la suspensión II con 10 μ l de eosina-nigrosina en un portaobjetos a 37°C. Tras dejar incubar la muestra durante 30 segundos, se realizó un frotis que se dejó secar sobre la placa térmica. Posteriormente, se observaron los frotis en microscopio óptico a campo claro a 40x (Nikon, Eclipse 400), contándose 100 células espermáticas y determinándose el porcentaje de espermatozoides vivos (EV) que son aquellos que aparecen de color blanco presentando por lo tanto la membrana íntegra. Por otra parte, las células que no tenían la membrana íntegra fueron incapaces de excluir la tinción apareciendo teñidas de color rosáceo y considerándose muertas (Figura 3).

2.5.2. Prueba de endósmosis celular

Para evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática se empleó la técnica descrita por Garde et al. (1998) para espermatozoides de ciervo. Para ello, se diluyeron 20 μ l la de suspensión espermática I en 200 μ l de solución hipoosmótica (Anexos) a una presión osmótica de 100mOsm/Kg, manteniéndose a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se fijaron con un solución tampón con 2% de glutaraldehído en 0,165 M de cacodilato de sodio/HCl (Anexos). Las muestras se evaluaron en microscopio óptico en contraste de fases a 40x (Nikon, Eclipse 400), contándose 100 células espermáticas y determinándose el porcentaje de espermatozoides que presentaban un

enrollamiento en la cola (E+) (Figura 3). Este enrollamiento es indicativo de funcionalidad de la membrana plasmática puesto que la célula intenta equilibrar la presión osmótica entre el medio intra y extracelular pasando agua a través de la membrana hacia el interior del espermatozoide y de esta forma se produce un aumento de volumen y un enrollamiento del flagelo (Drevius y Eriksson, 1966).

2.6. Estado del acrosoma

Para conocer el grado de integridad de la membrana acrosomal se diluyeron 5 µl de la suspensión espermática I en 250 µl de la solución fijadora tampón con 2% de glutaraldehído en 0,165 M de cacodilato de sodio (Anexos). Posteriormente, las muestras se observaron en microscopio óptico en contraste de fases a 40x (Nikon, Eclipse 400), contándose 100 células espermáticas y determinándose el porcentaje de espermatozoides con borde apical normal (NAR) los cuales fueron considerados como espermatozoides con acrosoma intacto (Figura 4).

2.7. Morfología espermática

Se determinó sobre las mismas muestras utilizadas para valorar el estado del acrosoma, evaluándose el porcentaje de espermatozoides normales sin gota citoplasmática (SG), con gota citoplasmática en posición proximal (GP) y con gota citoplasmática en posición distal (GD), contando para ello 100 células espermáticas (Figura 5).

3. CRIOPRESERVACIÓN

De la suspensión I se utilizaron 0,5 ml para la criopreservación. Para la congelación se utilizó el diluyente comercial Triladyl® con un 20% de yema de huevo siguiendo las recomendaciones del fabricante para la congelación de semen bovino y ovino. El diluyente se mezcló con la suspensión espermática I a temperatura ambiente y en un solo paso, añadiendo el volumen suficiente para que las pajuelas quedasen a una concentración aproximada de 100 millones de espermatozoides. La velocidad de enfriamiento hasta 5°C fue de 0,25°C/min. Posteriormente, las muestras se mantuvieron a esta temperatura durante 2 horas. Una vez completado este tiempo de equilibración las muestras se envasaron en pajuelas de 0,25 ml a 5°C y se congelaron durante 10 min sobre vapores de nitrógeno líquido colocándolas horizontalmente sobre una gradilla a una altura de 5 cm sobre el nivel del nitrógeno. Posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido permaneciendo almacenadas como mínimo 1 año antes de ser descongeladas.

4. DESCONGELACIÓN

Para descongelar las pajuelas se utilizó un baño térmico (Tectron 3000543) con ClNa al 8 ‰ a una temperatura de 37°C, donde las pajuelas fueron sumergidas durante 20 seg. Se descongelaron 2 pajuelas de cada macho, tras lo cual se realizaron todas las pruebas de calidad seminal descritas anteriormente, excepto la evaluación de la morfología.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1. CARACTERÍSTICAS SEMINALES RELACIONADAS CON LA CONGELABILIDAD

Con el objeto de predecir la resistencia a la congelación seminal a partir de la calidad seminal evaluada en diferentes momentos y mediante diferentes test in vitro, se desarrolló el siguiente experimento. Para ello, se utilizó el material espermático de todos los animales. Las técnicas de congelación y descongelación empleadas fueron las que se han descrito anteriormente. Asimismo, la evaluación seminal se realizó siguiendo los protocolos explicados en el apartado anterior.

5.1.1. Evaluación de la calidad seminal en diferentes momentos del proceso de congelación e incubación

Para realizar la contrastación seminal, se utilizaron las pruebas descritas en el apartado de análisis de la calidad seminal. Así, inicialmente, tras la recogida del material espermático en PBS se realizaron todas las pruebas de evaluación de la calidad seminal. La siguiente contrastación se realizó tras el proceso de refrigeración-equilibración, desarrollándose todas las pruebas anteriores excepto el porcentaje de EV. Otra evaluación se llevó a cabo inmediatamente después de la descongelación, analizándose solamente los parámetros de MI, CM, NAR, E+ y EV. Por último, se valoraron de nuevo las características cualitativas anteriores tras la incubación del material espermático descongelado en el diluyente de congelación durante 2 horas a 37°C.

Con el objeto de estimar la resistencia a la congelación para los parámetros de MI, NAR, E+ y EV se crearon unas nuevas variables representadas por: $CR- (variable) = (\text{valor descongelación} / \text{valor inicial}) \times 100$.

5.1.2. Inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio

Mediante esta prueba se intentó predecir la resistencia a la congelación de las muestras espermáticas. Para el estudio de la inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio se ha seguido el procedimiento descrito por Roldan y Harrison (1989). Así, los espermatozoides de la suspensión espermática I (muestras frescas) fueron estimulados con el ionóforo A23187 (1 μ M). La incubación se realizó a temperatura ambiente y a distintos tiempos (0, 5, 10, 15 y 30 min) se fijaron las muestras en una solución tampón con 2% de glutaraldehído en 0,165 M de cacodilato de sodio (Anexos). Las muestras se observaron en microscopio óptico de contraste de fases (40x), determinándose las células con acrosoma reaccionado (AR).

Para determinar el porcentaje de acrosomas que responde al inductor en un tiempo dado con respecto al tiempo inicial, se crearon unas variables representadas por $ARI (\text{tiempo}) = (\text{porcentaje de acrosomas reaccionados a un tiempo dado} / \text{porcentaje de acrosomas normales inicialmente (tiempo 0)}) \times 100$.

5.1.3. Prueba de resistencia térmica

Del mismo modo que en el apartado anterior, con esta prueba se pretendió predecir la resistencia a la congelación. Para ello, se siguió el protocolo desarrollado por Fiser et al. (1991) con algunas modificaciones. Así, se

diluyeron 20 µl de la suspensión espermática I en 500 µl de citrato-yema (Anexos), incubándose las muestras a 42°C durante 2 horas. La MI, CM y NAR fueron evaluados como se describió anteriormente en el momento de la dilución (0 min) y después de 60 y 120 min de incubación.

Por otra parte, para conocer lo que se conserva de las características seminales (MI y NAR) evaluadas a diferentes tiempos se definieron unas variables de resistencia térmica determinadas por: $(RT-) = (\text{calidad seminal a un tiempo dado} / \text{calidad seminal a tiempo 0}) \times 100$

5.1.4. Análisis estadístico

En primer lugar se realizaron análisis de comparación de medias para poner de manifiesto la existencia de diferencias entre los valores de las variables de calidad seminal evaluadas en los diferentes momentos del proceso de criopreservación y la calidad evaluada inicialmente.

Los análisis de componentes principales (ACP) se utilizan principalmente para reducir el número de variables iniciales a un número menor con el objeto de facilitar la comprensión de los estudios realizados (Hair et al., 1999; Sharma et al., 2001). Por ello, se realizó un ACP para poder reducir las variables de resistencia a la congelación a un número de variables menor y obtener una idea más global de esta característica. Para el ACP se utilizaron las variables de resistencia a la congelación CRMI, CRNAR, CRE+ y CREV, puesto que la congelabilidad no puede ser estudiada por una sola característica seminal (Thurston et al., 2002b). El ACP solamente extrajo un factor el cual fue indicativo de la resistencia a la congelación. Por último, para poder utilizar este nuevo factor como una variable y poderla integrar en los análisis estadísticos posteriores se utilizó el método de las puntuaciones factoriales. Este método consiste en calcular para cada

muestra la medida compuesta de las variables resistencia a la congelación introducidas en el ACP. De este modo, se obtuvo una variable indicativa de resistencia a la congelación con un valor para cada individuo y a la que se denominó “congelabilidad global” (CG).

Por último, la variable CG se utilizó para estudiar la relación con la calidad seminal inicial y tras la descongelación. Además, también se estudió la relación con las variables ARI y los parámetros de calidad seminal tras la prueba de resistencia térmica. Para ello, se realizaron análisis de regresión lineal simple donde la variable dependiente fue la CG y las variables independientes aquellas indicativas de la calidad seminal evaluadas en los diferentes momentos del proceso de criopreservación.

5.2.EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS AL MACHO SOBRE LA CONGELABILIDAD

Para realizar este experimento se utilizaron las mismas muestras espermáticas evaluadas en el apartado A, tanto inicialmente como a la descongelación.

El único parámetro extrínseco al macho que se estudió fue el mes de recogida de las muestras espermáticas. Entre los parámetros intrínsecos al mismo se evaluaron la edad, la variabilidad genética, la condición corporal y el grado de estrés.

5.2.1. Parámetros extrínsecos al macho

Los meses en los que se recogieron los testículos de los machos abatidos fueron: octubre (n=33), noviembre (n=62), diciembre (n=81), enero (n=39) y

febrero (n=25). Estas muestras se recogieron durante 3 temporadas de caza consecutivas: 1999/00 hasta 2001/02.

5.2.2. Parámetros intrínsecos al macho

Los análisis realizados para determinar la variabilidad genética de los machos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo Nacional de Ciencias Naturales. Los microsatélites usados fueron OarFCB193, OarFCB304, CelJP15, CelJP27, Cel JP38, MAF109, MAF35, OarCP26 y TGLA94. El número de alelos de los microsatélites osciló de 10 a 24. Para todos los ciervos de este estudio se evaluaron como mínimo 5 microsatelites, siendo el máximo 9. Una vez separados los alelos de cada microsatélite se calculó mediante una fórmula un valor indicador de consanguinidad o heterosis de cada individuo. Este valor se denominó d^2 media, el cual se define como la distancia entre los dos alelos que un individuo tiene en un locus de un microsatélite, promediando después por todo los loci que han sido evaluados en un individuo (como mínimo 5 y máximo 9). Esta medida indica la distancia genética entre los gametos que generaron al individuo, de modo que aquellos con una d^2 media baja es más probable que descendan de individuos más emparentados y por lo tanto de sufrir las consecuencias de la consanguinidad, mientras que los individuos con una d^2 media elevada es probable que descendan del cruce entre individuos de poblaciones divergentes y experimenten heterosis (Coulson et al., 1998; Coltman et al., 1998).

La edad se expresó en años y fue determinada en el laboratorio Matson's en Montana (EEUU). Esta técnica estima la edad a partir de determinadas líneas presentes en el cemento de los dientes (Mitchell, 1963).

La condición corporal se estimó mediante la cantidad de grasa acumulada alrededor del riñón puesto que es un buen indicador de la misma (Riney, 1955). Para ello, se determinó un índice indicativo de grasa renal representado por el peso de la grasa renal dividido por el peso del riñón y expresado en porcentaje (Figura 6).

Por último, para estimar el grado de estrés al que estuvieron sometidos los animales se determinó el peso de las glándulas adrenales, puesto que el tamaño de esta glándula aumenta con el estrés crónico (Shively y Kaplan, 1984; Pignatelli et al., 2002). Las medidas del peso de las glándulas se llevaron a cabo mediante una balanza de precisión (AND, FR-200 MK II), expresándose el mismo en g (Figura 7).

5.2.3. Análisis estadístico

En este experimento se llevó a cabo inicialmente un análisis de varianza mediante un modelo lineal general donde la variable dependiente fue la CG y la independiente el mes de obtención de las gónadas con el objeto de conocer si existían diferencias en la resistencia a la congelación para los distintos meses de recogida de los testículos. El mismo análisis fue realizado para las tasas de resistencia a la congelación.

Por otra parte, se realizaron análisis descriptivos de los parámetros intrínsecos. Posteriormente, se efectuaron análisis de correlación entre los parámetros intrínsecos al macho para conocer la dependencia entre ellos. En el supuesto de que fueran parámetros independientes, se estudiará la relación entre la CG y dichos parámetros, para las muestras recogidas en los meses en los que no existieron diferencias con respecto a la congelabilidad y en los que esta variable mostraba los mayores valores. Para ello, se realizó un análisis de regresión múltiple donde la variable

dependiente fue la CG y las independientes todos los factores intrínsecos al macho evaluados. Además, se mostraron mediante gráficos las relaciones entre los parámetros intrínsecos y las tasas de resistencia a la congelación.



Figura 1. Obtención post-mortem de las gónadas y retirada de las capas que recubren a las mismas.

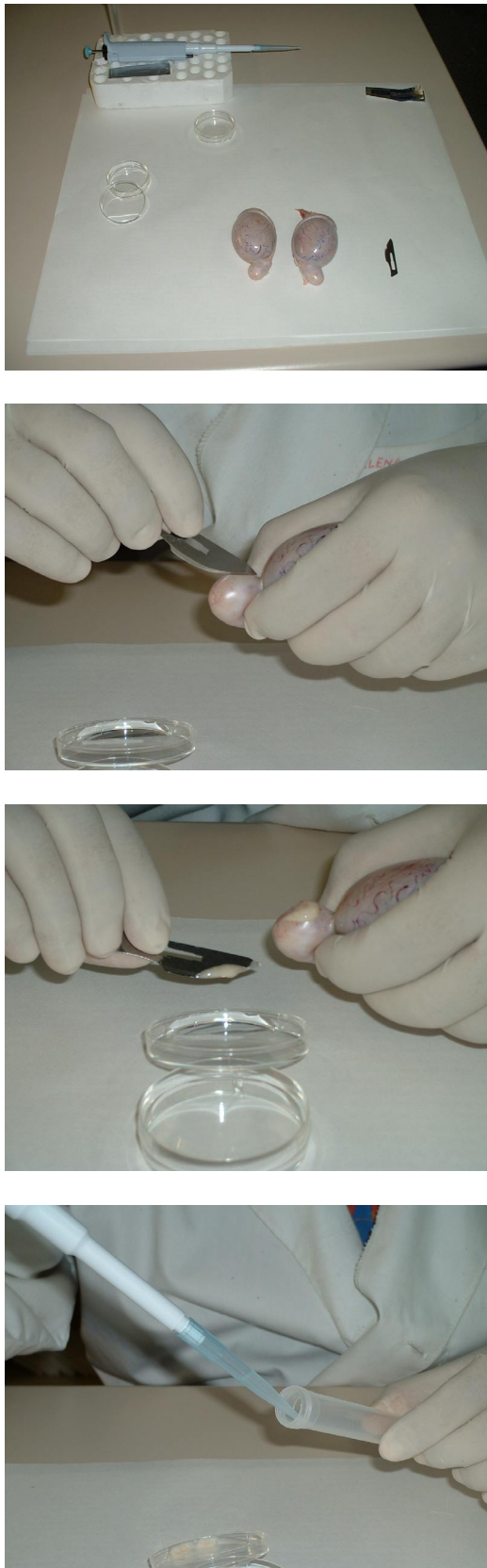
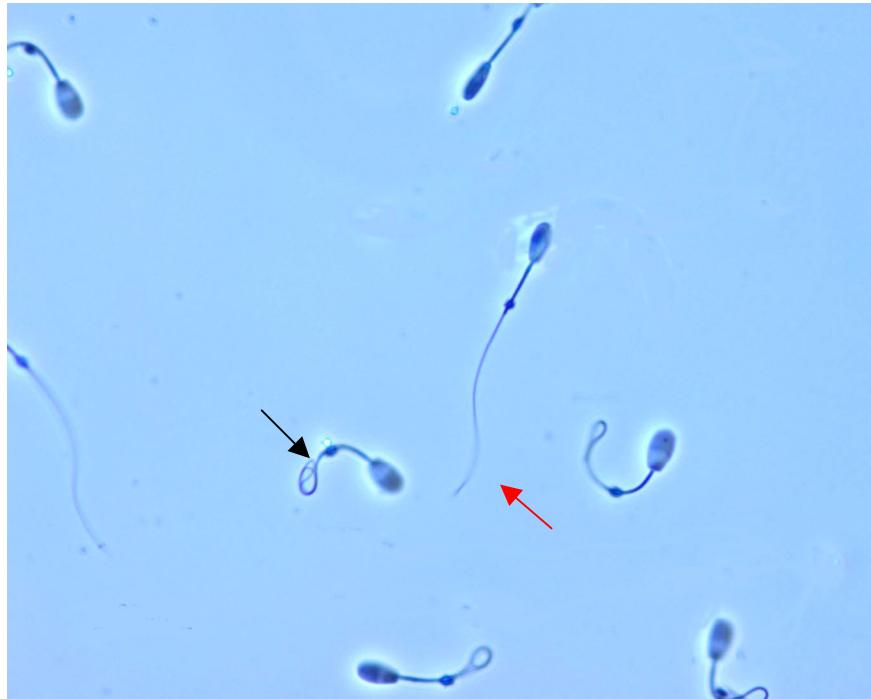


Figura 2. Obtención de los espermatozoides en PBS a partir de la cola del epidídimo de los testículos.

A)



B)



Figura 3. Evaluación de la funcionalidad e integridad de la membrana plasmática. A) prueba de endósmosis evaluada mediante microscopía de contraste de fases (x400). Flecha negra indica espermatozoide con cola enrollada y positivo al test hipoosmótico y flecha roja espermatozoide sin cola enrollada y negativo al test hipoosmótico. B) prueba de viabilidad evaluada mediante la tinción de eosina nigrosina (x1000). Flecha negra indica espermatozoide muerto y flecha roja indica espermatozoide vivo.

A)



B)



Figura 4. Evaluación del estado del acrosoma mediante contraste de fases (x1000). A) espermatozoide con acrosoma normal y B) espermatozoide sin acrosoma.

A)



B)



C)



Figura 5. Evaluación de la posición de la gota citoplasmática mediante contraste de fases (x400). A) espermatozoide normal sin gota citoplasmática, B) espermatozoide normal con gota citoplasmática proximal, C) espermatozoide normal con gota citoplasmática distal.

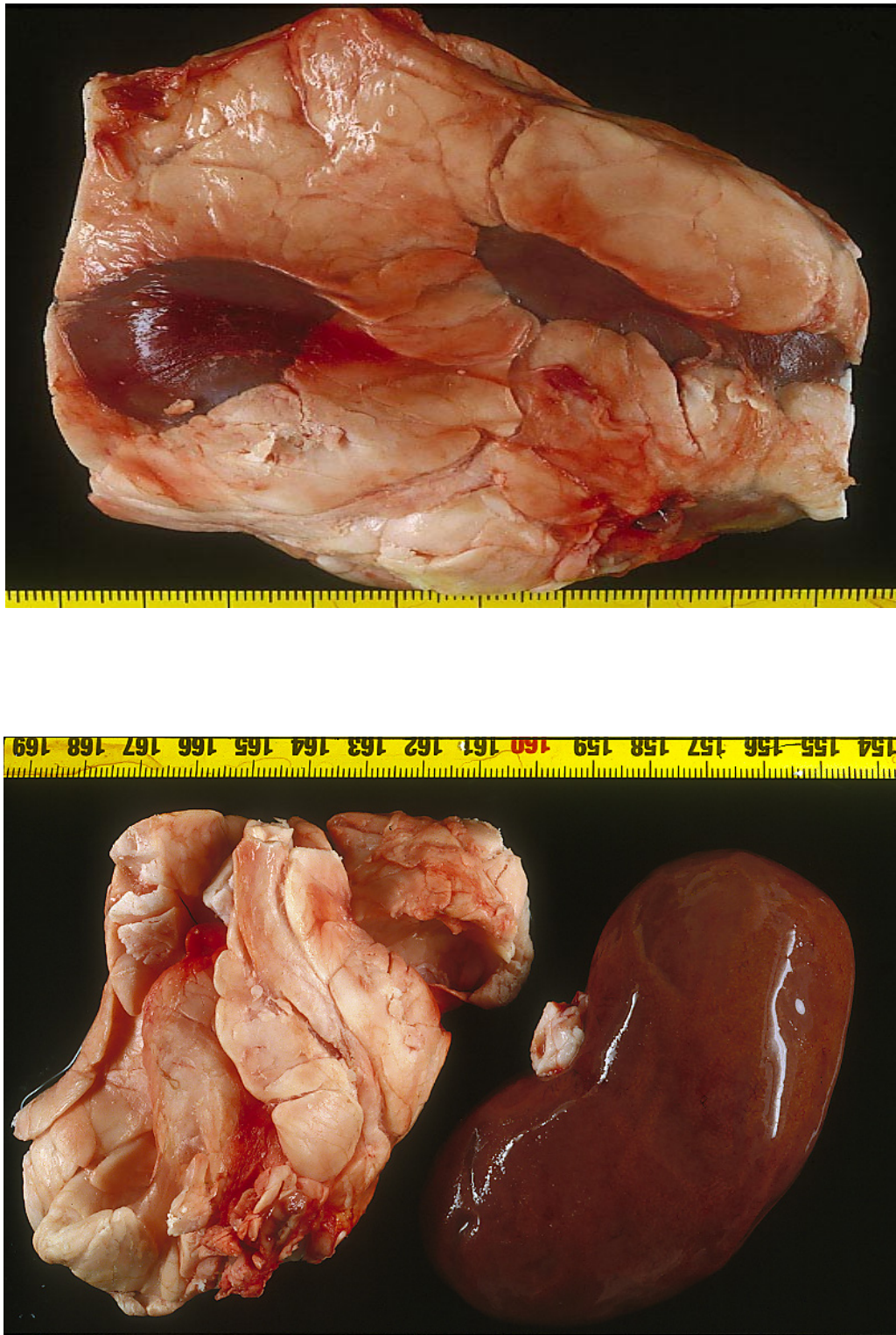


Figura 6. Estimación de la condición corporal evaluando la cantidad de grasa acumulada en el riñón.



Figura 7. Determinación del grado de estrés evaluando el peso de las glándulas adrenales.

RESULTADOS

A. CARACTERÍSTICAS SEMINALES RELACIONADAS CON LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA

En este apartado en primer lugar se muestran los parámetros descriptivos de las características seminales evaluadas en diferentes momentos de los procesos de congelación e incubación. Además, se calcularon los índices de resistencia a la congelación para los diferentes parámetros seminales estudiados para cada macho y con estas variables se realizó un ACP. En segundo lugar, se estudió mediante un análisis de regresión lineal el grado y tipo de relación entre las características seminales evaluadas en diferentes momentos del proceso de congelación y la CG. Las relaciones lineales entre las variables se han representado gráficamente cuando fueron significativas.

A.1. Características seminales del material espermático obtenido post-mortem en el ciervo ibérico evaluadas en diferentes momentos del proceso de congelación

En las Tablas 2 y 3 se muestran los valores medios, así como los coeficientes de variación (CV) y los rangos para los parámetros espermáticos evaluados inicialmente. En la Tabla 2 se presentan los parámetros cuantitativos: volumen (V), concentración (C) y número total de espermatozoides (NTE); y en la Tabla 3 los parámetros cualitativos: porcentaje de espermatozoides móviles (MI), calidad del movimiento (CM), porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales (NAR), porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+), porcentaje de espermatozoides vivos (EV) y porcentaje de espermatozoides normales con presencia o ausencia de gota citoplasmática. El 88,70% de los espermatozoides fueron clasificados como normales.

Tabla 2. Parámetros cuantitativos evaluados inicialmente en las muestras espermáticas obtenidas post-mortem

	Valor medio	CV (%)	Rango
Volumen	1,3	23	0,7-2,4
Concentración (x10⁶/ml)	1169	76	20-4840
NTE (x10⁶)	1663	99	16-10648

Tabla 3. Parámetros cualitativos evaluados inicialmente en las muestras espermáticas obtenidas post-mortem

	Valor medio	CV (%)	Rango
MI (%)	62,2	18	10-90
CM (0-5)	2,8	22	0,5-4
NAR (%)	92	11	69-99
E+ (%)	87	10	39-99
EV (%)	89,9	6	68-100
Spz sin gota (%)	10,1	89	0-73
Spz gota proximal (%)	10,3	160	0-98
Spz gota distal (%)	79,6	23	0-99

En la Tabla 4 se muestran las características seminales cualitativas evaluadas inmediatamente después del proceso de refrigeración-equilibración. El 87,63% de los espermatozoides fueron clasificados como morfológicamente normales.

Por otra parte, tras el proceso de descongelación se evaluaron de nuevo MI, CM, NAR, E+ y EV. Los valores medios, así como los CV y los rangos se muestran en la Tabla 5.

Resultados

Tabla 4. Parámetros cualitativos evaluados después del proceso de refrigeración-equilibración de las muestras espermáticas obtenidas post-mortem

	Valor medio	CV (%)	Rango
MI (%)	64,3	24	5-90
CM (0-5)	2,5	20	1-3,5
NAR (%)	88,8	12	42-100
E+ (%)	86,5	17	12-100
Spz sin gota (%)	10,2	71	0-61
Spz gota proximal (%)	9,2	161	0-97
Spz gota distal (%)	80,5	20	0-98

Tabla 5. Parámetros cualitativos evaluados después del proceso de congelación-descongelación de las muestras espermáticas obtenidas post-mortem

	Valor medio	CV (%)	Rango
MI (%)	52,6	33	0-83
CM (0-5)	2,7	18	0-4
NAR (%)	78,1	15	27-97
E+ (%)	65,0	25	16-99
EV (%)	76,9	14	32-98

Por último, tras el proceso de incubación de las muestras descongeladas los valores medios, así como los coeficientes de variación y los rangos para los parámetros espermáticos evaluados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cualitativos evaluados después de un proceso de incubación durante 2 h a 37°C de las muestras espermáticas descongeladas

	Valor medio	CV (%)	Rango
MI (%)	51,2	34	0-80
CM (0-5)	2,5	18	0-3,5
NAR (%)	51,7	29	13-81
E+ (%)	58,3	30	6-92
EV (%)	72,8	16	36-98

De la observación conjunta de las Tablas anteriores (3-6) se evidencia que la calidad seminal inicial disminuye con los diferentes pasos del proceso de congelación e incubación de las muestras espermáticas. De este modo, se realizaron análisis de comparación de medias relacionadas entre los valores de calidad seminal inicial y todos los evaluados en los distintos momentos del proceso. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las variables de calidad seminal evaluadas inicialmente y las variables de calidad seminal evaluadas después del proceso de refrigeración-equilibración, excepto para los porcentajes de endósmosis +, espermatozoides sin gota y de espermatozoides con gota en posición distal para los cuales no se encontraron diferencias significativas en los dos momentos de evaluación. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre la evaluación inicial y después de la descongelación para todas las variables de calidad seminal determinadas ($p < 0,001$), siendo mayor siempre el valor obtenido inicialmente en cada una de ellas. Igualmente tras el proceso de incubación de las muestras espermáticas los parámetros seminales evaluados fueron significativamente diferentes ($p < 0,01$) de los obtenidos después de la congelación, siendo los valores mayores a la descongelación.

A.2. Determinación de la variable “congelabilidad global”

Los valores de calidad seminal obtenidos tras el proceso de descongelación no indican el grado de deterioro registrado en las células espermáticas tras el proceso de congelación. Por este motivo, se definieron unas nuevas variables indicativas de la resistencia a la congelación para las variables MI, NAR, E+ y EV. Los valores medios, así como los CV y los rangos para la resistencia a la congelación de los diferentes parámetros espermáticos evaluados se muestran en la Tabla 7. Como se observa en dicha tabla, la característica seminal que menos se conserva después del proceso de congelación-descongelación es la funcionalidad de la membrana plasmática determinada por la prueba de endósmosis. Así, para esta característica

Resultados

indicativa de funcionalidad de membrana plasmática solamente se conserva tras el proceso de congelación-descongelación un 73,94% de su valor inicial.

Tabla 7. Parámetros de resistencia a la congelación para la movilidad e integridad de las membranas acrosomal y plasmática en las muestras espermáticas obtenidas post-mortem

	Valor medio	CV (%)	Rango
CRMI (%)	80,8	26	0-100
CRNAR (%)	84,0	14	35,5-100
CRE+ (%)	73,9	25	0-100
CREV (%)	85,3	14	32-100

Por otra parte, debido a la complejidad de estudiar la relación entre las cuatro variables de resistencia a la congelación y los diferentes parámetros de calidad seminal evaluados en diferentes momentos, se realizó un ACP para obtener un número menor de factores que fuesen representativos de la resistencia a la congelación. En dicho análisis solamente se extrajo un factor con un autovalor mayor de 2, lo cual quiere decir que este factor proporciona información como mínimo de 2 de las variables que inicialmente se han utilizado para el ACP. Por otra parte, este factor explica un 51% de la varianza de las 4 variables. El porcentaje de varianza de una variable, explicada por el resto de las variables introducidas en el ACP fue 0,53, 0,38, 0,56, y 0,59 para CRMI, CRNAR, CRE+ y CREV, respectivamente. Es decir, si las variables fuesen totalmente independientes este valor sería 0. Las cargas factoriales de este factor para CRMI, CRNAR, CRE+ y CREV fueron 0,72, 0,62, 0,75 y 0,77, respectivamente. Estas cargas factoriales representan la correlación de estas variables con el nuevo factor. Es decir todas las variables utilizadas en el ACP están correlacionadas de forma positiva con el factor extraído e indicativo de resistencia a la congelación. Por último, con el objeto de poder utilizar este nuevo factor como una variable en los análisis estadísticos

posteriores, se utilizó el método de las puntuaciones factoriales en el que se calculan para cada sujeto las medidas compuestas de estas cuatro variables de resistencia a la congelación introducidas en el ACP. El ACP trabaja con las variables estandarizadas para evitar las diferentes unidades en las que se expresan para calcular las puntuaciones factoriales. A la nueva variable se la denominó “congelabilidad global” (CG). La media y la desviación típica de la CG son respectivamente 0 y 1 (debido a la tipificación de las variables introducidas en el ACP), siendo los valores mínimo y máximo para la CG fueron respectivamente -3,67 y 1,61. Por lo tanto, las muestras seminales con puntuaciones factoriales negativas para la CG tendrán una menor resistencia a la congelación que aquellas positivas. Por otra parte, para el 40% de las muestras las puntuaciones factoriales fueron negativas.

A.3. Relación entre la calidad seminal inicial y la “congelabilidad global”

Para determinar si existe relación entre las variables de calidad seminal inicial y la CG se realizaron análisis de regresión lineal donde la variable dependiente en todos los casos fue la CG y las independientes todas las variables de calidad seminal evaluadas inicialmente. En la Tabla 8 se observa que las variables de calidad seminal inicial explican (definido por R^2) de forma muy débil la CG, lo que significa que no existe una relación lineal muy fuerte entre dichas variables. Por otra parte, la CG solamente es explicada de forma significativa por las variables C, NTE, MI, CM, GP y GD (Figura 8). En esta misma tabla se advierte, que el tipo de relación, determinado por el coeficiente de regresión estandarizado (Beta), entre las variables que explican de forma significativa la CG, es positiva para todas ellas excepto para el porcentaje de espermatozoides con gota proximal. De este modo, a mayor presencia de espermatozoides con gotas en posición proximal menor es el valor de la CG. De forma contraria, los valores de CG

Resultados

son mayores cuanto mayor son los valores de las variables NTE, MI, CM y GD.

Tabla 8. Relación lineal entre las variables de calidad seminal evaluadas inicialmente en las muestras espermáticas y la “congelabilidad global”

Variable dependiente	Variable independiente	R ²	Beta	Nivel significación
“Congelabilidad global”	Volumen	0,0	0,57	ns
	Concentración	0,3	0,17	**
	Nº total spz	0,02	0,13	*
	Spz móviles	0,07	0,27	***
	Calidad movimiento	0,05	0,22	***
	Acrosomas normales	0,0	0,06	ns
	Endósmosis +	0,0	0,04	ns
	Spz vivos	0,0	-0,03	ns
	Spz sin gota	0,0	-0,08	ns
	Spz gota proximal	0,03	-0,18	**
	Spz gota distal	0,04	0,20	**

***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns= no significativo

A.4. Relación entre la calidad seminal evaluada después del proceso de congelación-descongelación y la “congelabilidad global”

Del mismo modo que en el apartado anterior, para estudiar la relación probable entre los valores de calidad seminal obtenidos tras la descongelación y la CG, se realizaron análisis de regresión lineal donde la variable dependiente fue en todos los casos la CG y las independientes todas las variables de calidad seminal evaluadas después del proceso de congelación-descongelación (MI, CM, NAR, E+ y EV). En la Tabla 9 se observa, que las variables independientes explican (definido por R²) una mayor variabilidad de la CG que las variables de calidad seminal inicial. En la misma tabla se puede apreciar que la CG es explicada de forma significativa por todas las variables estudiadas. En la Figura 9 se

representan dichas relaciones. El tipo de relación (determinado por Beta) entre las variables indicativas de calidad seminal a la descongelación y la CG fue positiva de manera que, a mayor valor tras la descongelación para cualquier característica seminal evaluada, mayor fue la CG.

Tabla 9. Relación lineal entre las variables de calidad seminal evaluadas después de un proceso de congelación-descongelación en las muestras espermáticas y la “congelabilidad global”

Variable dependiente	Variable independiente	R ²	Beta	Nivel significación
“Congelabilidad global”	Spz móviles	0,50	0,71	***
	Calidad movimiento	0,08	0,28	***
	Acrosomas normales	0,43	0,66	***
	Endósmosis +	0,54	0,74	***
	Spz vivos	0,58	0,76	***

***p<0,001

A.5. Relación entre la inducción de la reacción acrosómica mediante el ionóforo de calcio A23187 y la “congelabilidad global”

En la Tabla 10 se observan los valores medios, CV y rangos para los acrosomas reaccionados (AR) tras incubar las muestras espermáticas frescas con el ionóforo A23187. Del mismo modo, los valores medios para las variables ARI se muestran en la Tabla 11. En esta última tabla se observa que a los 30 min la mayor parte de los espermatozoides están reaccionados por la acción del ionóforo de calcio.

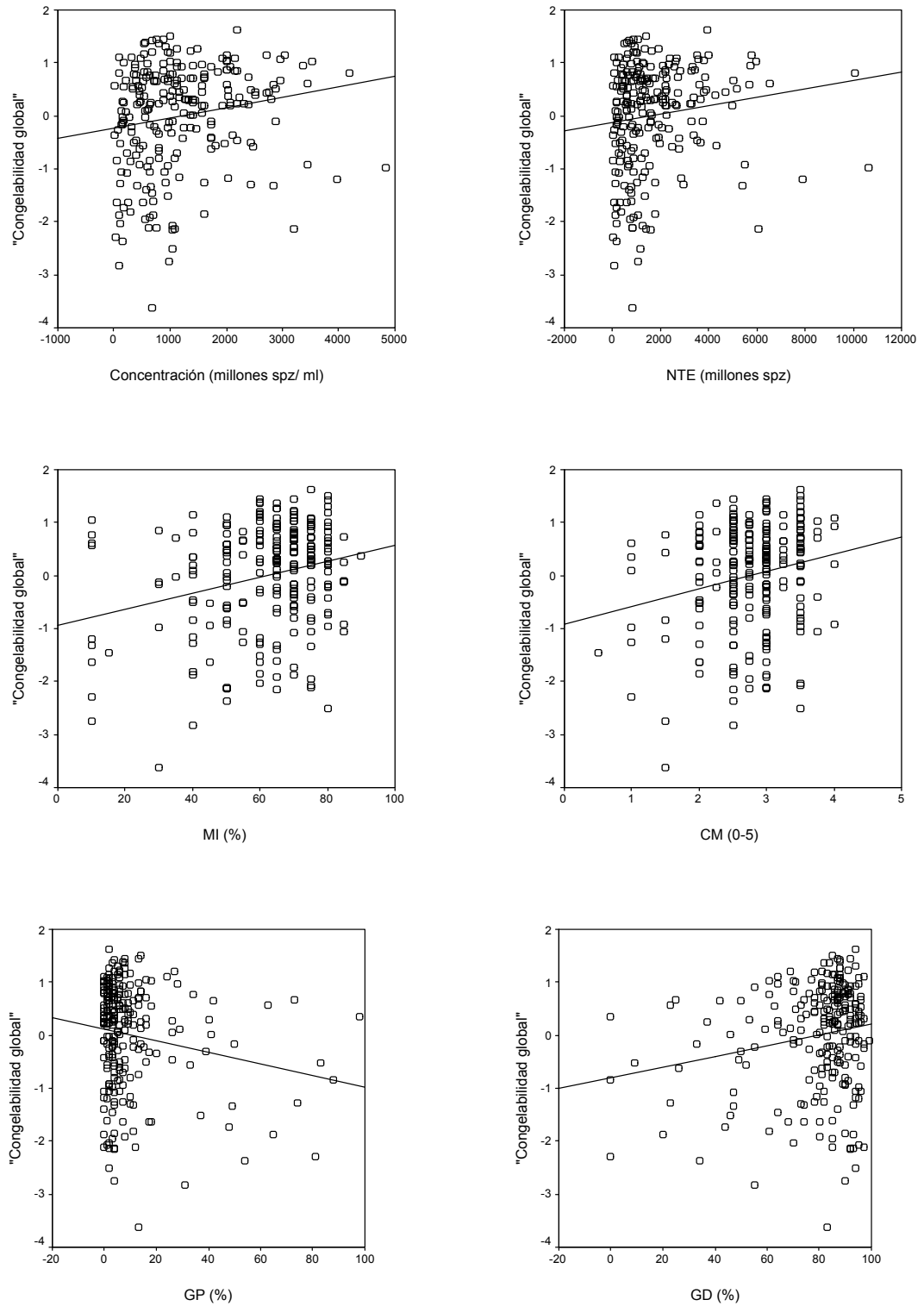


Figura 8. Relación lineal entre la CG y las variables de calidad seminal inicial: concentración, NTE, spz móviles (MI), calidad del movimiento (CM) y spz con gota en posición proximal (GP) y en posición distal (GD).

Tabla 10. Porcentaje de acrosomas reaccionados (AR) a distintos tiempos de incubación con el ionóforo de calcio en el material espermático fresco obtenido post-mortem

	AR 0 (%)	AR 5 (%)	AR 10 (%)	AR 15 (%)	AR 30 (%)
Valor medio	3,83	33,60	58,64	72,64	86,23
CV (%)	109	84	50	31	18
Rango	0,0-31,0	0,0-98,0	2,0-98,0	6,0-100,0	11,0-100,0

Tabla 11. Índice de reacción acrosómica inducida (ARI) por el ionóforo de calcio a distintos tiempos de incubación en el material espermático fresco obtenido post-mortem

	ARI 5 (%)	ARI 10 (%)	ARI 15 (%)	ARI 30 (%)
Valor medio	35,51	61,25	75,39	88,84
CV (%)	84	49	31	17
Rango	0,0-100,0	2,0-100,0	6,0-100,0	11,0-100,0

Para poner de manifiesto la posible relación entre la respuesta de los espermatozoides incubados con A23187 y la CG se realizaron análisis de regresión lineal donde la variable dependiente fue la CG y las variables independientes ARI 5, ARI 10, ARI 15 y ARI 30. En la Tabla 12 se observa, que las variables ARI a cualquier tiempo dado explican (determinado por R^2) ligeramente la CG. Además, se aprecia que las variables que explicaron de forma significativa la CG fueron ARI 5 y ARI 10. Esta relación se expresa gráficamente en la Figura 10. Por otra parte, el tipo de relación (determinado por Beta) entre estas variables y la CG fue negativa en ambos casos, lo cual significa que a mayor respuesta de los acrosomas al ionóforo a los 5 y 10 min, menores son los valores de CG (Tabla 12, Figura 10).

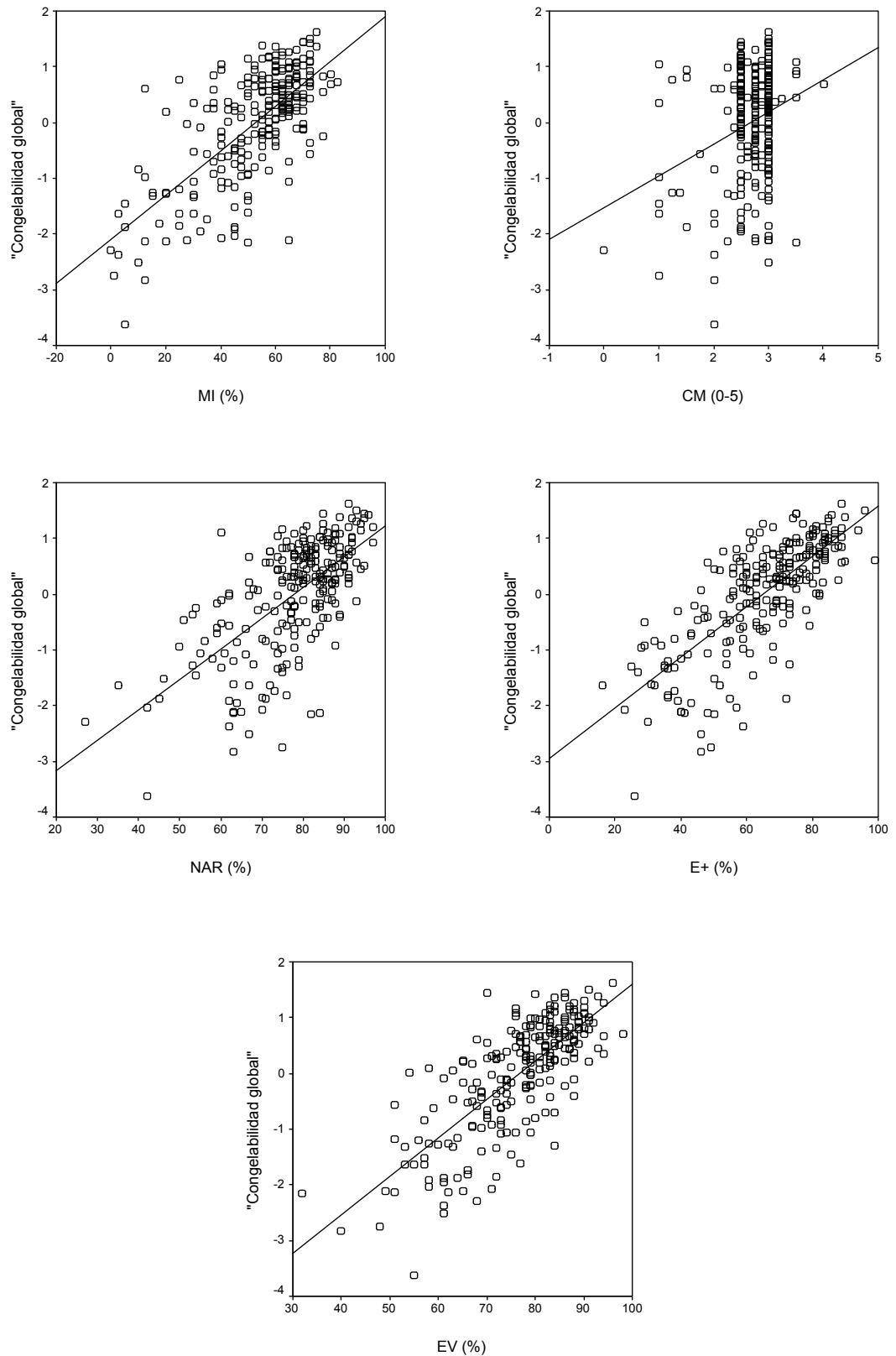


Figura 9. Relación lineal entre la CG y las variables de calidad seminal: spz móviles (MI), calidad del movimiento (CM), acrosomas normales (NAR), endósmosis + (E+), y spz vivos (EV), evaluadas después de la congelación-descongelación de las muestras espermáticas

Tabla 12. Relación lineal entre las variables de respuesta al ionóforo de calcio en diferentes tiempos de incubación de las muestras espermáticas frescas y la “congelabilidad global”

Variable dependiente	Variable independiente	R ²	Beta	Nivel significación
“Congelabilidad global”	ARI 5	0,04	-0,22	***
	ARI 10	0,02	-0,15	*
	ARI 15	0,0	-0,09	ns
	ARI 30	0,0	0,04	ns

***p<0,001; *p<0,05; ns= no significativo

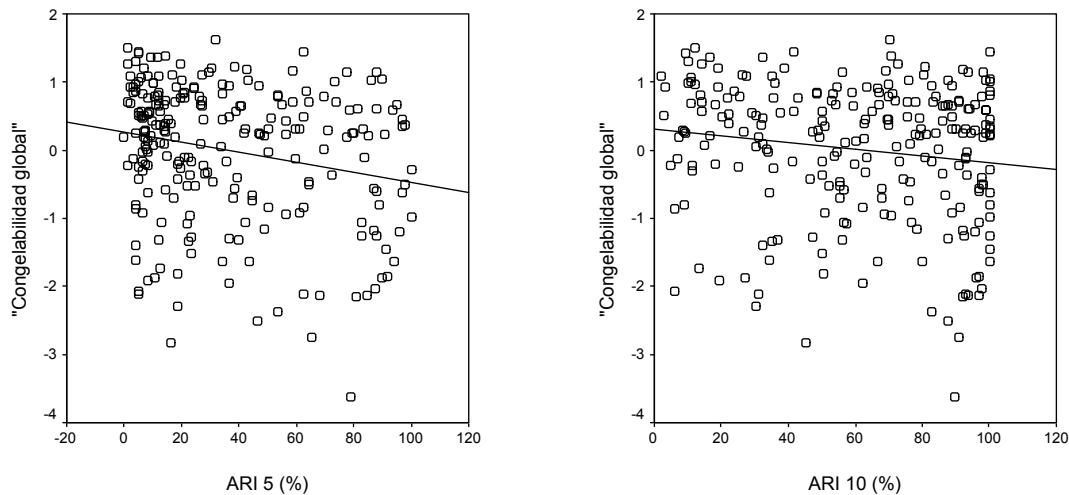


Figura 10. Relación lineal entre las variables de respuesta al ionóforo de calcio a diferentes tiempos de incubación de las muestras espermáticas frescas y la “congelabilidad global”

A.6. Relación entre la calidad seminal evaluada después una prueba de resistencia térmica y la “congelabilidad global”

En la Tabla 13 se muestran los resultados para MI, CM y NAR evaluados a diferentes tiempos después de someter a las muestras espermáticas iniciales o frescas a una prueba de resistencia térmica. Por otra parte, los

Resultados

valores medios, CV y los rangos para las tasas de resistencia térmica de las muestras espermáticas se muestran en la Tabla 14. De este modo, se advierte que la integridad de la membrana acrosomal resiste mejor la incubación a altas temperaturas que la movilidad espermática.

Tabla 13. Parámetros de calidad seminal evaluados a diferentes tiempos después una prueba de resistencia térmica de las muestras espermáticas frescas obtenidas post-mortem

	Valor medio	CV	Rango
MI 0 (%)	61,4	29	5-90
CM 0 (0-5)	2,5	28	0,5-3,5
NAR 0 (%)	92,9	6	73-100
MI 60 (%)	44,8	43	0-85
CM 60 (0-5)	1,9	42	0-3,5
NAR 60 (%)	85,5	10	41-100
MI 120 (%)	31,8	60	0-75
CM 120 (0-5)	1,3	53	0-3
NAR 120 (%)	77,3	17	32-98

Tabla 14. Parámetros de resistencia térmica para la movilidad e integridad de la membrana acrosomal en las muestras espermáticas frescas obtenidas post-mortem

	RTMI 60 (%)	RTNAR 60 (%)	RTMI 120 (%)	RTNAR 120 (%)
Valor medio	74,9	91,8	49,3	83,2
CV (%)	31	8	54	15
Rango	0-100	53-100	0-100	40-100

Por otra parte, para conocer si existía alguna relación entre la resistencia térmica para las diferentes variables evaluadas a distintos tiempos y la CG se realizaron análisis de regresión lineal entre estas variables, siendo la variable dependiente la CG y las variables independientes aquellas indicativas de resistencia térmica para MI y NAR. Estos resultados se

presentan en la Tabla 15, en la que se observa que las variables de resistencia térmica explican (determinado por R^2) de forma débil la CG. Por otra parte, se advierte que las únicas variables que explican de forma significativa la CG son RTMI 60 y RTMI 120. Esta relación se representa gráficamente en la Figura 11. El tipo de relación (definido por Beta) entre las variables anteriores y la CG fue positiva, de modo que a mayor movilidad después de una prueba de resistencia térmica a los 60 y 120 minutos, mayor es el valor de la CG.

Tabla 15. Relación lineal entre las variables de resistencia térmica para las diferentes características seminales evaluadas a diferentes tiempos en las muestras espermáticas frescas y la “congelabilidad global”

Variable dependiente	Variable independiente	R^2	Beta	Nivel significación
“Congelabilidad global”	RTMI 60	0,04	0,22	***
	RTNAR 60	0,0	-0,07	ns
	RTMI 120	0,02	0,16	**
	RTNAR 120	0,0	0,02	ns

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; ns=no significativo

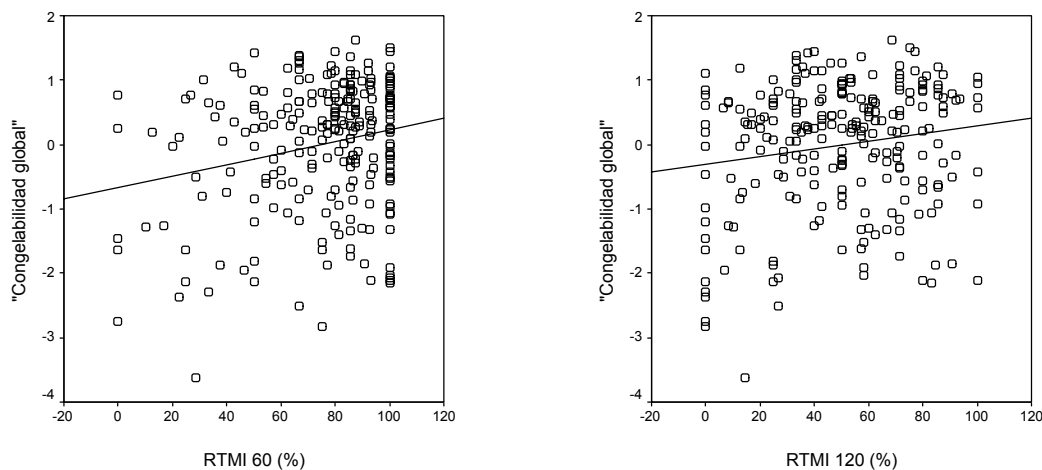


Figura 11. Relación lineal entre las variables de resistencia térmica para la movilidad espermática evaluadas a diferentes tiempos en las muestras espermáticas frescas y la “congelabilidad global”

B. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS AL MACHO SOBRE LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA

B.1. Efecto del mes de obtención de las muestras sobre la congelabilidad espermática

Con respecto al mes, los valores medios corregidos para la CG en los diferentes meses estudiados se representan en la Figura 12. Así, se observa en dicha figura que los valores menores de CG se obtienen en los meses de octubre, enero y febrero con respecto a los obtenidos en los meses de noviembre y diciembre.

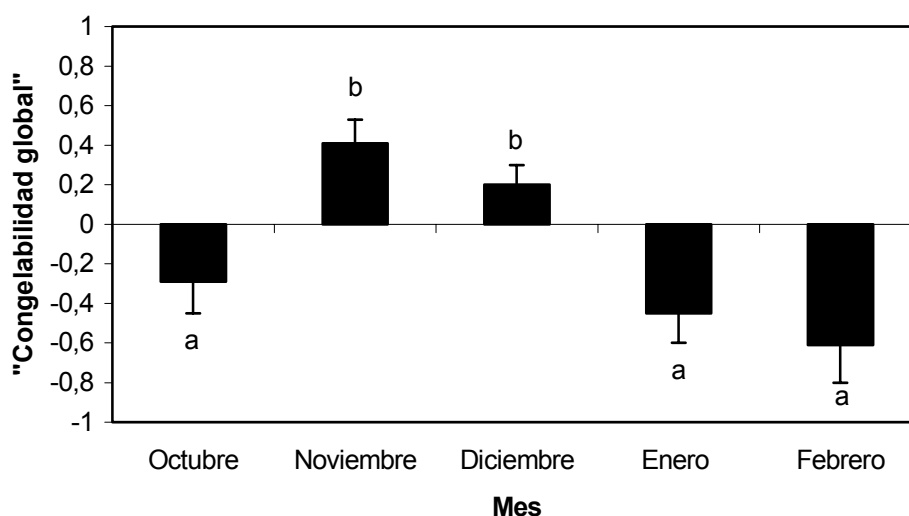


Figura 12. Medias marginales estimadas \pm SEM para la GG evaluada en diferentes meses. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos meses ($p < 0,05$)

Por otra parte, en la Figura 13 se representan los valores medios de las tasas de resistencia a la congelación durante los diferentes meses

evaluados. De este modo, se observa que durante los meses de enero y febrero los valores obtenidos para CRMI; CRNAR, CRE+ y CREV son menores que para los meses de octubre, noviembre y diciembre.

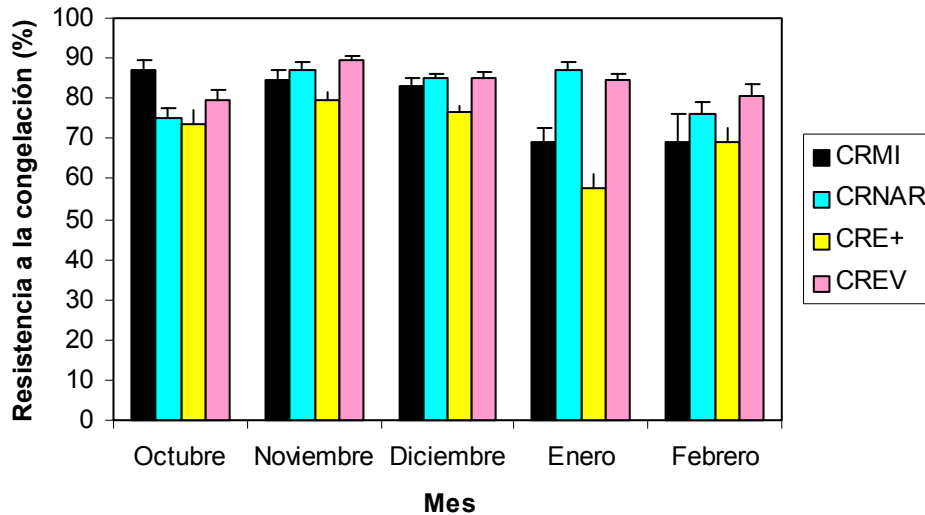


Figura 13. Medias \pm SEM para las tasas de resistencia a la congelación para la movilidad (CRMI), acrosomas normales (CRNAR), test hipoosmótico (CRE+) y porcentajes de espermatozoides vivos (CREV) evaluadas en diferentes meses

B.2. Efectos de los parámetros intrínsecos al macho sobre la congelabilidad espermática

En la Tabla 16 se muestran los valores medios, CV, así como los rangos, para las variables intrínsecas al macho: edad, d^2 media, índice de grasa renal y peso de las adrenales, obtenidos durante los meses de noviembre y diciembre que fueron aquellos en los que no se observaron diferencias significativas y el valor de la CG fue mayor. Además, en la figura 14 se muestra la distribución de frecuencias de dichas variables.

Resultados

Tabla 16. Valores medios de los factores intrínsecos al macho

	Valor medio	CV (%)	Rango
Edad (años)	6,3	48	2-15
d² media	87,9	63	3,5-328,5
Índice grasa renal (%)	17,9	59	5,5-55,6
Peso adrenales (g)	2,8	24	1,5-4,2

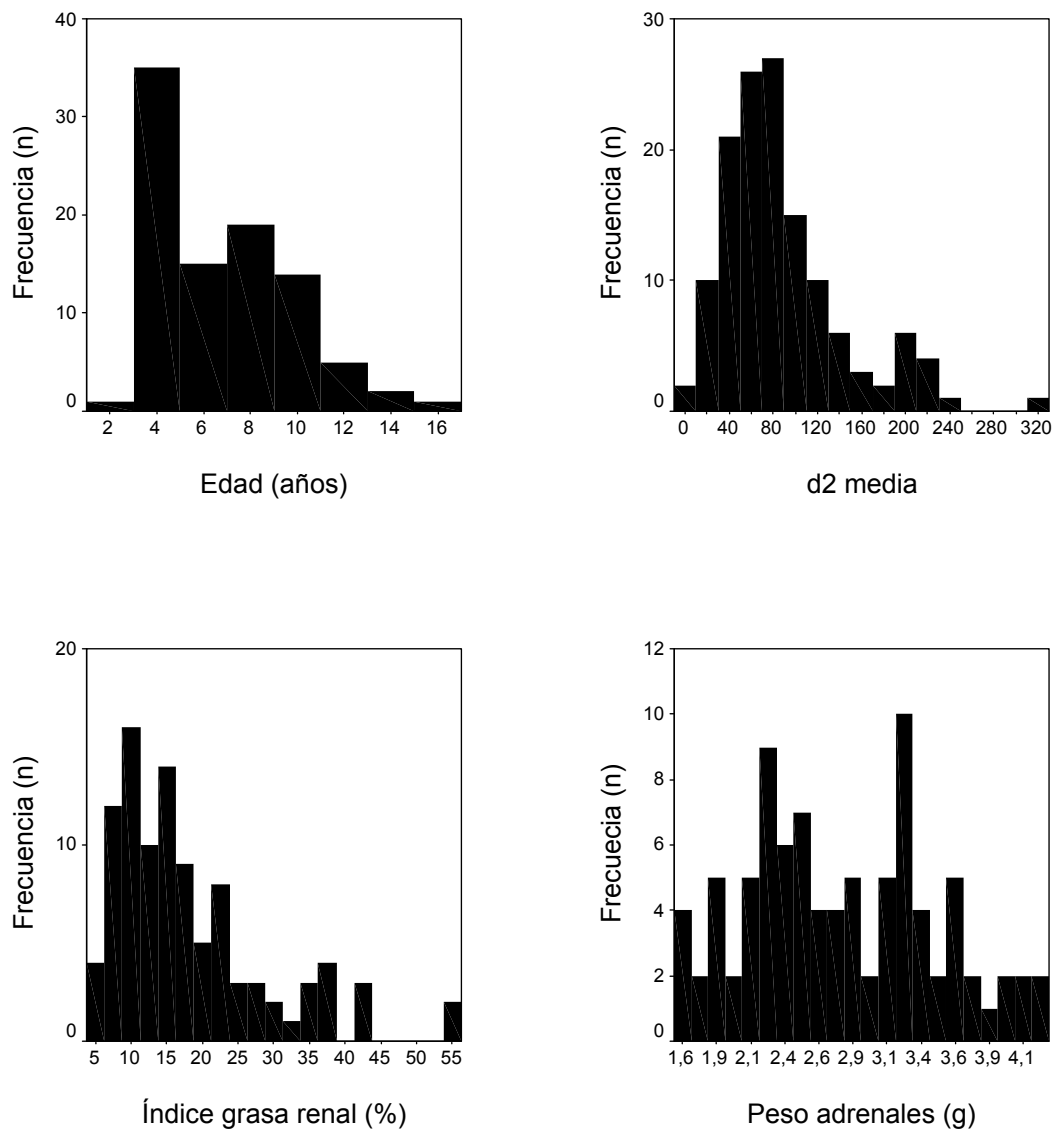


Figura 14. Distribución de frecuencias de las variables intrínsecas al macho

Por otra parte, en la Tabla 17 se representan las correlaciones entre todos los parámetros intrínsecos al macho evaluados, observándose que no existieron correlaciones entre los mismos.

Una vez realizado el análisis de regresión múltiple con todos los parámetros intrínsecos al macho como variables independientes, se observa que la variabilidad genética representada por la σ^2 media, la condición corporal determinada por el índice de grasa renal y el grado de estrés establecido por el peso de las adrenales, influyen de forma significativa y negativamente sobre la congelabilidad global. Así, cuanto mayor son los valores de σ^2 media, índice de grasa renal y peso de las adrenales peor es la resistencia a la congelación (Tabla 18). Sin embargo, la edad no influyó de forma significativa sobre la CG.

Por otra parte, en las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestra la relación entre las variables intrínsecas al macho y cada tasa de resistencia a la congelación.

Tabla 17. Coeficientes de correlación entre los parámetros intrínsecos al macho. Arriba de la diagonal se representan los coeficientes de correlación y debajo de la diagonal el nivel de significación

	Edad	σ^2 media	Índice grasa renal	Peso adrenales
Edad	-	-0.06	-0.04	0,03
σ^2 media	0.55	-	0.07	0.08
Índice grasa renal	0.74	0.55	-	-0.07
Peso adrenales	0.8	0.41	0.50	-

Resultados

Tabla 18. Relación lineal entre los parámetros intrínsecos al macho y la congelabilidad global

Variable dependiente	Variable independiente	Beta	Nivel significación
"Congelabilidad global"	Edad	-0,14	ns
	d^2 media	-0,28	*
	Índice grasa renal	-0,31	*
	Peso adrenales	-0,27	*

$R^2=0,31$; * $p<0,04$; ns=no significativo

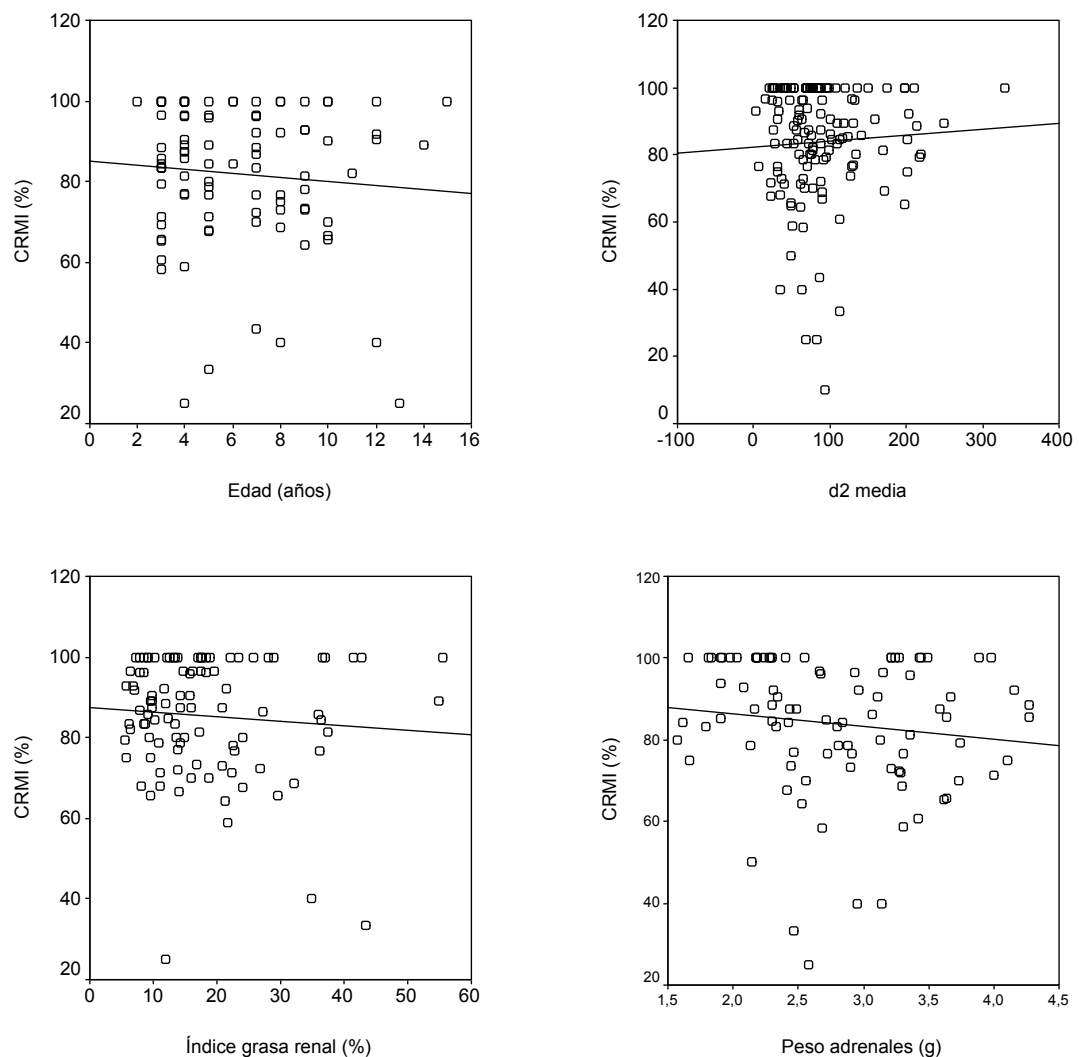


Figura 15. Relación entre la resistencia a la congelación para MI (CRMI) y los parámetros intrínsecos al macho

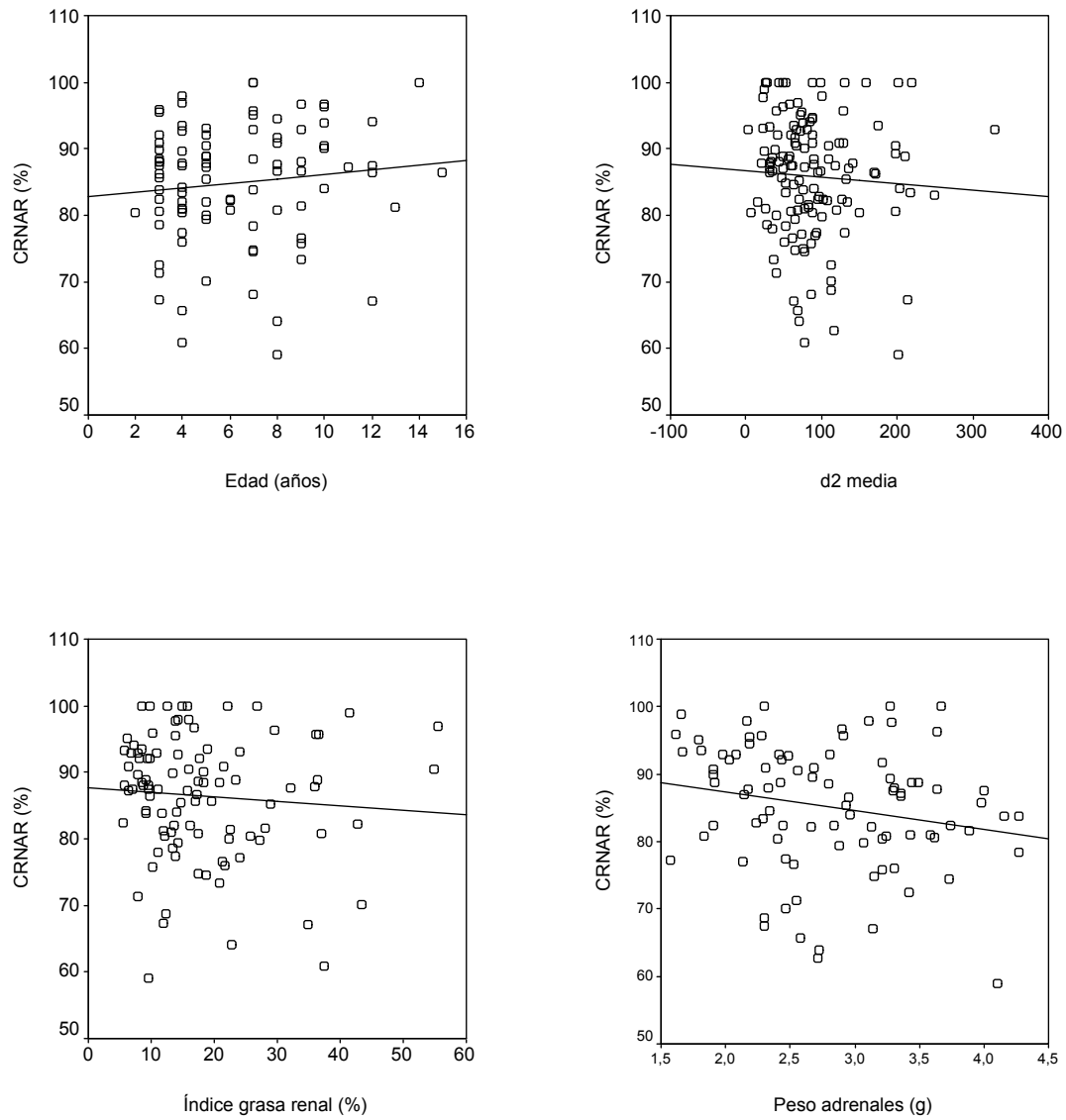


Figura 16. Relación entre la resistencia a la congelación para NAR (CRNAR) y los parámetros intrínsecos al macho

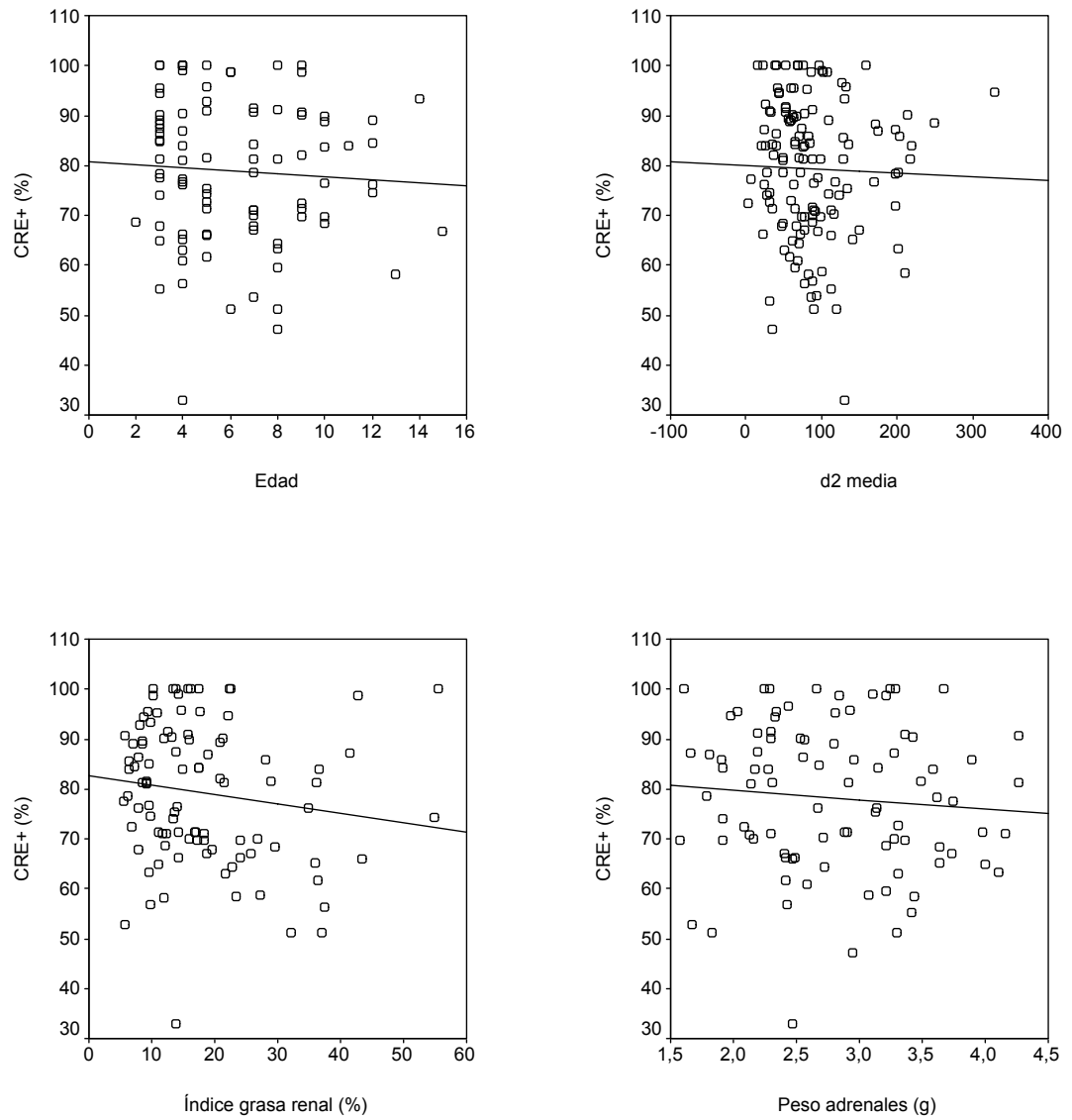


Figura 17. Relación entre la resistencia a la congelación para E+ (CRE+) y los parámetros intrínsecos al macho

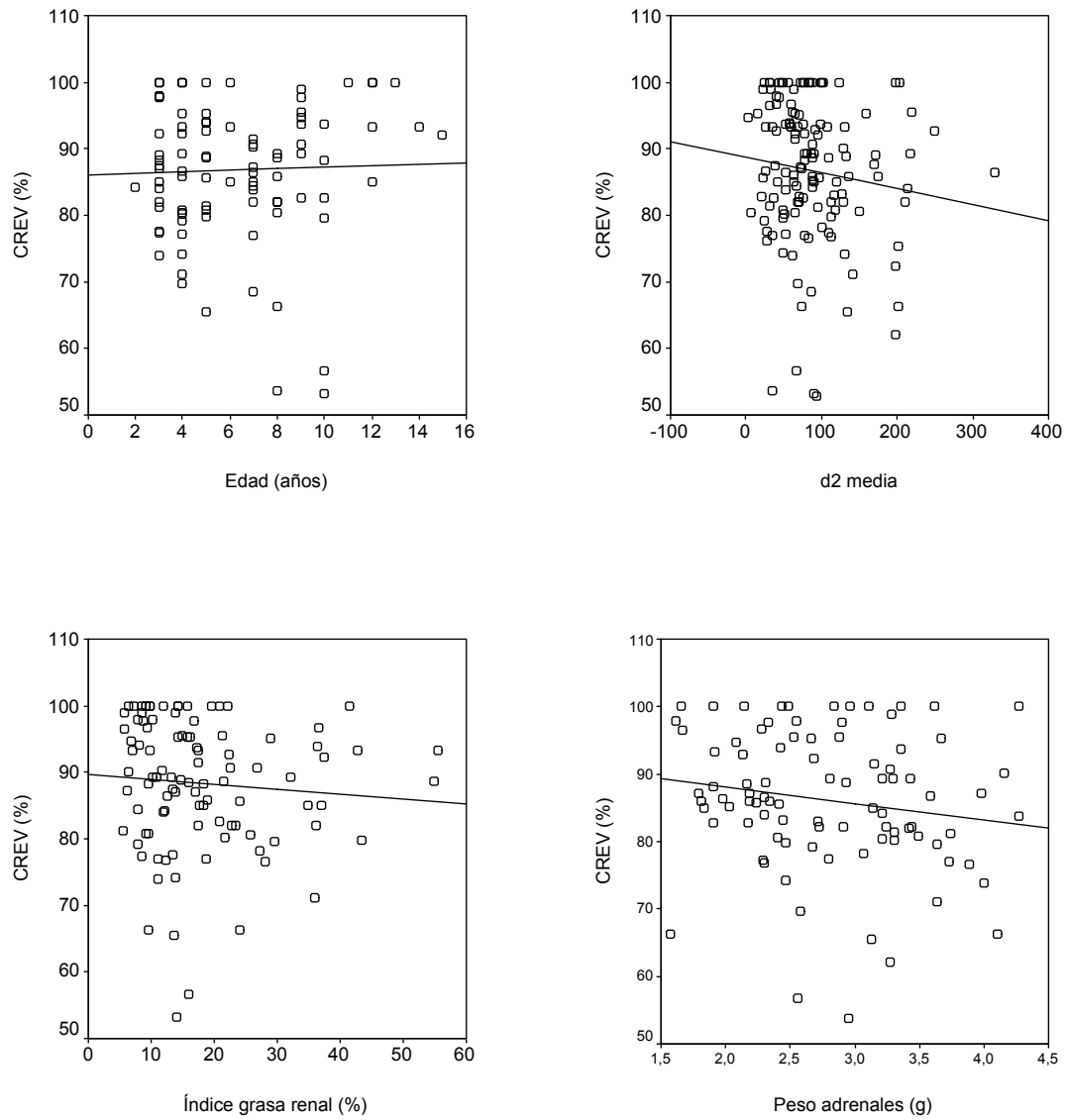


Figura 18. Relación entre la resistencia a la congelación para EV (CREV) y los parámetros intrínsecos al macho

DISCUSIÓN

A. CARACTERÍSTICAS SEMINALES RELACIONADAS CON LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA

A.1. Características seminales del material espermático obtenido post-mortem en el ciervo ibérico evaluadas en diferentes momentos del proceso de congelación

Los resultados obtenidos en este estudio sobre las características seminales para el ciervo ibérico coinciden con lo reportado por otros autores en ciervo rojo, aunque en la mayoría de estos trabajos no se ha utilizado un gran número de pruebas de evaluación seminal “in vitro” y el número de animales empleado ha sido bastante reducido. Así, el rango en el que se encuentra el NTE para el ciervo ibérico coincide con lo reportado para ciervo rojo (Miles et al., 1992, Gizejewski et al., 1998). Sin embargo, en esos estudios el valor medio del NTE fue mayor que en nuestro trabajo. Estas diferencias pueden ser debidas al diferente momento en el que se obtuvieron las muestras espermáticas, puesto que en los trabajos anteriores el semen se recogió durante la época de berrea donde la producción espermática es mayor (Strzezek et al., 1985; Nikodémusz et al., 1986). Esto también ha sido puesto de manifiesto por otros autores en el ciervo de cola blanca (Mirarchi et al., 1977). Además pueden existir diferencias en la producción espermática para las distintas subespecies de ciervos. Por otra parte, los procedimientos utilizados para la recogida del material espermático pudieron variar en relación a este trabajo y por lo tanto afectar al NTE obtenido.

Teniendo en cuenta las características cualitativas evaluadas inicialmente, el porcentaje medio de espermatozoides móviles fue de un 62%, mientras que en otros trabajos el porcentaje de movilidad inicial en espermatozoides epididimarios de ciervo rojo osciló entre un 10 y un 90% (Krzywinski, 1981; Miles et al., 1992; Garde et al., 1998; Gizejewski et al., 1998; Ortiz, 1999 y

Zomborszky et al., 1999). Además, los valores de NAR y E+ fueron de un 92 y un 87%, respectivamente. Sin embargo, Garde et al. (1998) en estudios realizados en ciervo ibérico encontraron porcentajes ligeramente más bajos de acrosomas normales y respuesta al test hipoosmótico (60% y 72%, respectivamente) que los obtenidos en nuestro trabajo. Estas diferencias pudieron ser debidas a que dichos autores obtuvieron los testículos durante la época de berrea (septiembre-octubre), que es cuando más cubriciones se producen, y por lo tanto la calidad seminal de los espermatozoides obtenidos en este periodo puede ser peor porque permanecen menos tiempo madurando en el epidídimo. En este mismo sentido, otros autores han observado en ciervo rojo una mayor cantidad de formas anormales, determinada por defectos en el acrosoma y un menor volumen en el macho dominante (Gizejewski et al., 1998). Los machos dominantes son los que más actividad sexual tienen durante la época de berrea (Bartos y Perner, 1998) y por lo tanto presentan una alta frecuencia de eyaculaciones. Aunque se tienen pocos resultados en estos ungulados, existen diferentes estudios realizados en otras especies que demuestran que una elevada frecuencia de recogida de semen afecta a la calidad seminal. Así, las recogidas seminales en morueco y macho cabrío con tan solo 1 día de descanso dan lugar a una baja calidad del semen obtenido (Ollero et al.; 1996; Shamsuddin et al., 2000). Por otra parte, en cerdo se observa que una intensa frecuencia de recogida de semen aumenta la proporción de espermatozoides anormales y disminuye la movilidad, al mismo tiempo que se producen alteraciones en determinados marcadores bioquímicos (Bonet et al., 1993; Strzezek et al., 1995). Por último, Holt et al. (1996) reportaron en gacela dama que los machos que permanecían en grupos mixtos donde pueden llevar a cabo montas, eran los que más defectos presentaban en el acrosoma de sus espermatozoides.

Con respecto a la morfología, el 79% de los espermatozoides epididimarios morfológicamente normales presentaron gota citoplasmática en posición distal lo que concuerda con lo obtenido por Garde et al. (1998) y Ortiz (1999) en esta misma subespecie. La presencia de espermatozoides con

gota citoplasmática en posición distal en la cola del epidídimo se considera normal (Salisbury et al., 1961; Amann et al., 1982; Barth y Oko, 1989; White, 1993). Sin embargo, la presencia de espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal en la cola del epidídimo no es normal, siendo más numerosos este tipo de espermatozoides en la cabeza del epidídimo (Amann et al., 1982; Barth y Oko, 1989; White, 1993). Además, Barth y Oko (1989) observaron que la presencia en eyaculados de espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal es un indicativo de otras anomalías en el espermatozoide. Por otra parte, este tipo de espermatozoides se presenta sobre todo en animales jóvenes, indicando inmadurez del desarrollo testicular. Por otro lado, si se presenta en animales adultos puede ser indicativo de procesos degenerativos (Barth y Oko, 1989), alta frecuencia de recogida seminal (Bonet et al., 1993; Garde et al., 1999b) o de la estacionalidad reproductiva (Haigh et al., 1984; Monfort et al., 1993).

Por último, hemos encontrado que el porcentaje de EV inicialmente es de un 89%, estando este valor muy próximo al obtenido previamente por Ortiz (1999) en muestras espermáticas epididimarias de esta misma subespecie.

Como se desprende de los resultados obtenidos en este trabajo, después del proceso de refrigeración y equilibración se encontraron diferencias significativas en la calidad seminal con respecto a los valores obtenidos inicialmente, excepto para la E+, espermatozoides sin gota citoplasmática y con gota citoplasmática en posición distal (Tablas 3 y 4). Los valores obtenidos fueron menores para la mayoría de los parámetros espermáticos evaluados excepto para la MI que fue mayor después de la refrigeración-equilibración. Estos resultados, contrastan con los reportados por Ortiz (1999) utilizando la misma velocidad de enfriamiento y el mismo tiempo de equilibración que en nuestro trabajo, puesto que esta autora no encontró diferencias significativas para los parámetros de calidad seminal evaluados inicialmente y tras la disminución de la temperatura. Sin embargo, otros

autores observaron en búfalos que después del proceso de refrigeración-equilibración algunas características espermáticas, como la viabilidad, el porcentaje de acrosomas normales y los parámetros cinemáticos, disminuyeron en comparación con los reportados inicialmente (Lambrechts et al., 1999; Rasul et al., 2001).

Igualmente, tras la congelación-descongelación se observó, que la calidad seminal disminuye de forma significativa con respecto a los valores iniciales para todos los parámetros evaluados (Tablas 3 y 5). La disminución de la calidad seminal después de un proceso de congelación-descongelación también ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores en diferentes especies (Salamon y Maxwell, 1995a; Watson, 1995; Ollero et al., 1998; Amann, 1999; Leibo y Bradley, 1999; Ortiz, 1999; Curry, 2000; Holt, 2000a; Watson, 2000; Rasul et al., 2001).

Por último, se encontró que después de la incubación de las muestras descongeladas los valores de calidad seminal disminuyeron con respecto a los valores a la descongelación (Tablas 5 y 6). El parámetro espermático que menos resistió el proceso de incubación fue el porcentaje de acrosomas normales, perdiendo aproximadamente un 34%. Sin embargo, los parámetros de MI y EV fueron los que mejor resistieron la incubación. Resultados muy similares han sido reportados por Ortiz (1999), trabajando con muestras heteroespéricas obtenidas del epidídimo en la misma subespecie.

A.2. Determinación de la variable “congelabilidad global”

Para determinar exactamente el grado de deterioro en las células espermáticas originado por el proceso de criopreservación se crearon unas variables indicativas de resistencia a la congelación para los diferentes

parámetros, puesto que las muestras inicialmente no partían con la misma calidad. Así, los valores para CRMI, CRNAR, CRE+ y CREV fueron respectivamente 80, 84, 73 y 85%. Aunque ha sido reportado por diferentes autores que durante la criopreservación de los espermatozoides de diferentes especies se pierde aproximadamente un 50% de viabilidad espermática (Salamon y Maxwell, 1995a; Watson, 1995; Amann, 1999; Leibo y Bradley, 1999, Curry, 2000; Holt, 2000a; Watson, 2000), nuestros resultados indican que las muestras espermáticas epididimarias de ciervo ibérico conservan bastante bien las características de movilidad e integridad de membrana plasmática y acrosomal, lo cual coincide con lo obtenido en otras especies de cérvidos por otros autores. Así, Platz et al. (1982) obtuvieron en ciervo de cola blanca una CRMI de un 98%. Sin embargo, Ortiz (1999) en ciervo ibérico encontró una CRMI menor que la nuestra (~55%), aunque la CRNAR obtenida en este último trabajo fue similar a la reportada en esta tesis (~85%). Por otra parte, el parámetro que menos se conservó en nuestro estudio fue la integridad de la membrana medida por medio de la prueba de endósmosis celular. Con esta prueba se somete a la célula a un estrés, ya que se le incuba en una solución hipoosmótica para valorar posteriormente la integridad de la membrana plasmática (Jeyendran et al., 1984), siendo las células espermáticas que han sido congeladas más susceptibles a un estrés como el producido por la prueba de endósmosis por tener unas membranas más débiles o dañadas (Correa y Zavos, 1996).

Por último, el ACP se realizó utilizando varias variables indicativas de resistencia a la congelación para diferentes parámetros debido a que la congelabilidad no puede ser evaluada por una sola característica seminal (Thurston et al., 2002b). Se utilizaron los parámetros de resistencia a la congelación para MI, NAR, E+ y EV porque para que se produzca la fertilización el espermatozoide tiene que ser móvil y tener íntegras las membranas plasmática y el acrosomal (Amann, 1989; Holt, 2000a, b).

A.3. Relación entre la calidad seminal inicial y la “congelabilidad global”

Tras el proceso de congelación-descongelación la función espermática queda dañada. El daño producido en las células puede ser debido a muchas causas (formación de cristales de hielo, “efecto solución”, reordenamiento de los lípidos de la membrana alterándose la permeabilidad de la misma, etc...). Por otro lado, las diferencias encontradas entre los resultados de los diversos estudios pueden deberse al diluyente utilizado, a las velocidades de refrigeración, congelación y descongelación, así como al crioprotector empleado y a la concentración del mismo (Watson, 1975; Mazur, 1984; Parks y Graham, 1992; Salamon y Maxwell, 1995a; Watson, 1995; Watson, 2000; Watson y Fuller, 2000; Holt, 2001). Sin embargo, una vez determinado el mejor proceso tecnológico para la congelación de los espermatozoides de una especie se advierte que existen diferencias con respecto a la resistencia a la congelación para los diferentes machos, encontrándose muestras espermáticas muy afectadas por este proceso (Holt, 2000b; Leibo y Bradley, 1999).

En los centros de inseminación los animales que a priori tienen una baja calidad seminal inicial no se utilizan en los programas de inseminación artificial y por lo tanto su semen no llega nunca a congelarse, utilizándose solamente muestras de alta calidad seminal. En el caso de otras especies, como aquellas en peligro de extinción o en animales de gran valor genético que mueren por alguna causa, es muy importante congelar su semen independientemente de la calidad inicial del mismo (Ballou, 1992; Johnston y Lacy, 1995; Roth et al., 1999). En el caso del ciervo ibérico, muchas veces es necesario congelar sus espermatozoides, una vez muerto el animal, por el valor económico del mismo. Por ello, en este trabajo una vez utilizada la metodología más apta para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico, siguiendo las pautas desarrolladas por Ortiz (1999) en la misma subespecie, se congelaron las

muestras de animales con muy diferente calidad seminal inicial y se estudió si estas diferencias en la calidad seminal inicial podían tener alguna relación con la resistencia a la congelación.

Para ello, se realizaron análisis de regresión lineal entre las diferentes variables de calidad seminal inicial y la CG. Así, la CG fue explicada de forma significativa por C, NTE, MI, CM, GP y GD. Sin embargo, los coeficientes de determinación obtenidos indican que las variables de calidad seminal inicial explican de forma muy débil la CG. Esto mismo ha sido puesto de manifiesto en trabajos realizados en otras especies. Así, cuando se relaciona la resistencia a la congelación con parámetros seminales iniciales esta relación o es muy débil o no existe. Fiser y Fairfull (1983) encontraron en morueco una relación entre la resistencia a la congelación para la movilidad y dicho parámetro antes de congelar, aunque la correlación fue muy pequeña ($r=0,01$). Del mismo modo, Fernandes et al. (1990) observaron en semen de la especie humana la misma relación pero con un coeficiente de determinación bajo ($R^2= 0,04$, $p=0,01$). Además, otros autores no pudieron predecir la resistencia a la congelación en función de la calidad seminal inicial (Beck y Silverstein., 1975; McLaughlin et al., 1992). Por otra parte, en distintos trabajos se ha mostrado una relación entre los valores absolutos de calidad seminal inicial y los obtenidos a la descongelación (Heuchel et al., 1983; Kramer et al., 1993; Russell et al.; 1995; Nothling et al.; 1997; Thomas et al.; 1998).

La relación entre los parámetros cuantitativos (C y NTE) y los parámetros cualitativos (MI y CM) con la CG fue positiva en todos los casos. La producción espermática y las características de movilidad en ungulados se encuentran afectadas por la edad, la estación del año, la frecuencia de eyaculación y la genética (Amann y Almquist, 1962; Foote et al., 1976; Mirarchi et al., 1977; Kumi-Diaka et al., 1981; Nikodémusz et al., 1986; Gosch y Fischer, 1989; Hafez, 1989; Strzezek et al., 1995; Ollero et al., 1996; Garde et al., 1998; Mathevon et al., 1998; Roldan et al., 1998; Garde

et al., 1999a, b; Gomendio et al., 2000; Shamsuddin et al., 2000; Anel et al., 2001; Brito et al. 2002; Jung et al., 2002; Thurston et al., 2002a). Por lo tanto, las muestras espermáticas con una baja concentración, así como aquellas que tienen una baja movilidad inicial puede ser que en general estén asociadas a alteraciones funcionales y estructurales de las células espermáticas por los motivos expuestos anteriormente, lo cual puede influir negativamente en la resistencia a la congelación de las mismas.

Con respecto a las características morfológicas de los espermatozoides, se observó una relación significativa pero negativa entre la presencia de gota citoplasmática en posición proximal y la CG. Durante el tránsito por las diferentes regiones del epidídimo los espermatozoides llevan a cabo su proceso de maduración, produciéndose cambios en la estructura y en la función de la membrana plasmática y posiblemente en el metabolismo energético (White, 1993; Amann, 1988). Este proceso de maduración va acompañado del desplazamiento de la gota citoplasmática desde la zona proximal de la pieza intermedia del espermatozoide a la zona distal de la misma (Amann et al., 1982; Amann, 1988). De este modo, en la cabeza del epidídimo la mayor parte de los espermatozoides tiene gota citoplasmática en posición proximal, mientras que en la cola se encuentra en posición distal (Amann et al., 1982).

El desplazamiento de la gota citoplasmática también ha sido puesto de manifiesto en células espermáticas de ciervo ibérico por Ortiz (1999). Así, un 70% de los espermatozoides presenta gota en posición proximal en la cabeza del epidídimo, mientras que un 76% de los mismos la porta en posición distal en la cola de esta estructura. Por lo tanto, la presencia de espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal en la cola del epidídimo no se considera normal puesto que su frecuencia de aparición en esta zona es muy baja. Del mismo modo, en trabajos en los cuales las muestras seminales provienen de eyaculados de diferentes especies, incluidos los cérvidos, la aparición de gota citoplasmática en

posición proximal se considera una morfoanomalía y su presencia puede deberse a muchos factores como la estacionalidad, la edad de los animales, (siendo más frecuente su aparición en animales jóvenes), la actividad sexual intensa debido a una frecuencia de eyaculación alta y a las altas temperaturas (Larsson y Einarsson, 1984; Haigh et al., 1985; Barth y Oko, 1989; Gosh y Fischer, 1989; Bonet et al., 1993; Garde et al., 1999; Thundathil et al., 2001; Brito et al., 2002). Además la presencia de este tipo de espermatozoides indica una falta de madurez y suele estar asociada a la aparición de otras formas anormales (Barth y Oko, 1989). Así, Thundathil et al. (2001) observaron que los eyaculados de toro que tenían una alta frecuencia de espermatozoides con gotas citoplasmáticas en posición proximal presentaban peor movilidad y menor capacidad para unirse a la zona pelúcida, sugiriendo que esos espermatozoides son funcional o estructuralmente deficientes. Consecuentemente, si este tipo de célula espermática presenta alteraciones estructurales o de otro tipo es posible que muestre una menor resistencia a la congelación como ocurre en nuestro trabajo. Además, otros autores también han encontrado en eyaculados provenientes de perros una relación negativa entre la presencia de espermatozoides con gota en posición proximal en semen fresco y la movilidad después de la descongelación (Nothling et al., 1997).

Con respecto a las gotas citoplasmáticas en posición distal, se encontró una relación significativa y positiva con la CG. La presencia de este tipo de espermatozoides en la cola del epidídimo se considera normal puesto que la frecuencia de aparición de los mismos en esta parte del testículo es alta. Además, estas células se consideran maduras (Yanagimachi, 1988). Por lo tanto, al ser espermatozoides funcional y estructuralmente maduros pueden presentar una mayor resistencia al proceso de congelación que si se tratase de formas inmaduras. No existe en ciervos ningún trabajo que ponga de manifiesto la relación anterior. Sin embargo, Nothling et al. (1997) contrariamente a nuestros resultados encontraron una relación negativa entre la presencia de gotas citoplasmáticas en posición distal en los espermatozoides de eyaculado de perro y la movilidad después de la

descongelación. Estas diferencias pueden ser debidas a que las muestras obtenidas en el trabajo anterior procedían de eyaculados donde la presencia de estas células no se considera normal según diferentes autores (Ombelet et al., 1995) y por lo tanto dichas células no fueran funcional y estructuralmente maduras. Además, Nothling et al. (1997) relacionan la presencia de espermatozoides con gota en posición distal con el valor absoluto de movilidad después de la descongelación y no con lo que resiste esta característica tras el proceso de criopreservación.

Por último, aunque algunos parámetros de calidad seminal inicial explican de forma significativa la “congelabilidad global”, lo hacen de una forma muy débil. Este hecho puede ser debido a que los parámetros de calidad seminal evaluados no son indicativos de resistencia a la congelación. Los acontecimientos que tienen lugar en las células espermáticas durante la congelación se basan principalmente en cambios osmóticos. Por lo tanto, es posible que las pruebas evaluadas en este estudio sean independientes de la resistencia al estrés osmótico por parte de la célula espermática. Así, algunos autores han sugerido que la sensibilidad de los espermatozoides a la congelación depende de la resistencia de los mismos al estrés osmótico (Curry y Watson, 1994; Noiles et al., 1997). Otros autores han utilizado otros métodos de evaluación seminal para predecir la calidad tras la descongelación, utilizando para ello variables cinemáticas y la morfometría medida de forma objetiva (Russell et al., 1995; Gravance et al., 1998; Thurston et al., 2001).

También es posible que las pruebas de calidad seminal inicial no puedan predecir la resistencia a la congelación porque la muestra esté formada por subpoblaciones de espermatozoides con distinta congelabilidad. Así, en estudios realizados en diferentes especies se ha puesto de manifiesto la presencia de subpoblaciones de espermatozoides en un eyaculado en función de varios parámetros espermáticos (Abaigar et al., 1999; Thurston et al., 1999; Abaigar et al., 2001; Quintero et al., 2002). alguna de estas

subpoblaciones halladas mediante la evaluación de diferentes características puede correlacionarse con la congelabilidad, no poniéndose de manifiesto dicha relación cuando se trata la muestra como un “todo”.

A.4. Relación entre la calidad seminal evaluada después del proceso de congelación-descongelación y la “congelabilidad global”

Los resultados obtenidos han demostrado que todas las variables de calidad seminal medidas tras el proceso de congelación-descongelación explican de forma significativa la CG. Por otra parte, la mayor parte de la variabilidad obtenida en la CG fue explicada por dichas variables de calidad seminal, siendo el grado de asociación entre las distintas variables y la CG muy fuerte. Además, se observó que dichas relaciones fueron positivas de modo que cuanto mayor fue el valor obtenido en las variables después de la descongelación mayor fue la CG. Hasta la fecha, no ha existido ningún trabajo en ciervos que haya puesto de manifiesto la relación entre variables de calidad seminal después de un proceso de descongelación y la congelabilidad del semen. Sin embargo, Fiser y Fairfull (1983) encontraron, de forma similar a nosotros pero trabajando con semen morueco, una relación entre la resistencia a la congelación para la movilidad y los valores de movilidad y calidad del movimiento obtenidos después de descongelar.

Por otra parte, los valores de los coeficientes de determinación obtenidos entre las variables de calidad seminal medidos tras la descongelación y la CG son muy altos, lo que indica que las relaciones entre dichas variables son fuertes. Diversos autores han observado que después del proceso de congelación se produce una pérdida de heterogeneidad con respecto a la calidad seminal de las muestras, obteniéndose una población que es indicativa de resistencia a la criopreservación (Watson, 1995; Maxwell y Watson, 1996; Ollero et al., 1998; Curry, 2000). Además, se ha observado que la frecuencia de las poblaciones espermáticas que contiene un

eyaculado varía con la congelación y con la refrigeración, pudiendo incluso llegar a desaparecer alguna de ellas (Abaigar et al., 2001; Quintero et al., 2002). Así, es posible que exista una fuerte relación entre la calidad seminal obtenida después de la descongelación y la resistencia a la congelación puesto que, las poblaciones que quedan son indicativas de espermatozoides resistentes a un proceso de congelación, independientemente de las características seminales evaluadas después de este proceso. Además, esta relación se pone de manifiesto incluso al tratar la muestra espermática conjuntamente, como en nuestro caso.

A.5. Relación entre la inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio A23187 y la “congelabilidad global”

Después de un proceso de criopreservación las muestras espermáticas permanecen en un estado que se asemeja al de capacitación (Critser et al., 1987; Zaneveld et al., 1991; Garde, 1993; Watson, 1995; Pérez et al., 1996). Esto es debido a que cuando disminuye la temperatura por debajo de la fase de transición, se produce un movimiento de los componentes de la membrana (lípidos y proteínas) que lleva asociado un aumento de la permeabilidad de la misma, entrando una mayor cantidad de calcio al interior de la célula y promoviendo la capacitación y la reacción acrosómica (Robertson y Watson, 1987; Bailey y Buhr, 1993; White, 1993; Watson, 1995). Por otra parte, la incubación de las muestras con un ionóforo de calcio induce la entrada de calcio en la célula, originando un incremento muy importante en la tasa de reacción acrosómica (Shams-Borhan y Harrison, 1981; Fraser, 1995). Por lo tanto, en ambos procesos (criopreservación e inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo) se produce una desestabilización de la membrana plasmática que origina una entrada masiva de calcio en el interior celular, la cual es responsable de la aparición de un gran número de espermatozoides que experimentan la reacción acrosómica. Debido a lo expuesto anteriormente, podría existir alguna relación entre ellos, y por tanto que fuese posible

predecir la resistencia de una muestra a la congelación en función de su respuesta a la incubación con un ionóforo de calcio antes del proceso de congelación.

Los valores resultantes de las variables ARI obtenidos en nuestro trabajo son muy similares a los reportados por Ortiz (1999) en espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo de ciervo ibérico. Como se puede observar en la Tabla 10, a los 30 min de incubación con el ionóforo, la mayoría de los espermatozoides han experimentado la reacción acrosómica inducida por dicho antibiótico. Además, se han encontrado relaciones negativas entre las variables ARI 5 y ARI 10 y la CG, explicando las mismas de una forma muy leve la CG. No existe ningún trabajo en cérvidos en el que se haya puesto de manifiesto una relación entre la respuesta de los espermatozoides al ionóforo de calcio y la resistencia a la congelación de los mismos. Sin embargo, Szász et al. (2000) encontraron en espermatozoides de perro una relación positiva entre los espermatozoides reaccionados por el ionóforo y los que lo presentaban dañado el acrosoma por la criopreservación. Las diferencias encontradas entre los resultados de Szász et al. (2000) y los nuestros podrían deberse a distinto motivos. Los autores anteriores utilizaron los valores absolutos obtenidos a la descongelación, no teniendo en cuenta el porcentaje de espermatozoides que conservaban el acrosoma después del proceso de congelación. Además, ellos evaluaron la respuesta al ionóforo a los 60 min, no valorando la respuesta a tiempos intermedios como nosotros puesto que a los 60 min es posible que la mayor parte de los espermatozoides tengan el acrosoma reaccionado como ha quedado demostrado en nuestro estudio.

La relación negativa encontrada entre las variables independientes ARI a los 5 y 10 min y la CG para las muestras espermáticas epididimarias de ciervo, indica que cuanto más rápida es la respuesta al ionóforo de calcio en las muestras de semen fresco peor es la resistencia a la congelación de

las mismas. Puede ser que las muestras espermáticas que tengan una mayor proporción de espermatozoides con las membranas desestabilizadas inicialmente sean más susceptibles a experimentar la reacción acrosómica en un menor tiempo tras la incubación con el ionóforo. De este modo, Watson et al. (1991) encontraron una variabilidad en la respuesta a la inducción de la reacción acrosómica mediante un ionóforo de calcio en los diferentes moruecos que utilizaron, lo que indica una diferente sensibilidad de las membranas de los espermatozoides a este inductor. Además, es probable que los mismos espermatozoides que responden de forma rápida al ionóforo inicialmente, posiblemente por poseer unas membranas desestabilizadas, sean los que resistan peor un estrés como el producido por la criopreservación. Aunque es deseable que las muestras espermáticas respondan al ionóforo de calcio tras el periodo de incubación por que si no puede revelar la presencia de infertilidad (Garde et al., 1997b), una respuesta muy rápida durante la incubación puede ser indicativa de una mayor sensibilidad de las membranas del espermatozoide dando lugar a la entrada masiva de calcio produciéndose la reacción acrosómica y acortándose la vida media del espermatozoide. No existe ningún trabajo al respecto en el que se haya estudiado el efecto del tiempo de incubación con el ionóforo frente a la estabilidad de la membrana, pero si esta hipótesis fuese cierta es admisible la relación negativa obtenida en nuestros resultados entre la CG y ARI 5 y ARI 10, no encontrándose ya dicha relación a los 15 y 30 min, ya que a esos tiempos la mayor parte de los espermatozoides están con el acrosoma reaccionado.

Por último, las relaciones encontradas entre las variables independientes y la dependiente fueron muy débiles pudiendo deberse a que este tipo de prueba no sea válido para evaluar la resistencia a la congelación porque el mecanismo responsable de los sucesos que ocurren en los espermatozoides durante la incubación con el ionóforo y que dan lugar a células espermáticas con el acrosoma reaccionado, no tenga ninguna relación con los eventos que ocurren en el espermatozoide durante la criopreservación, a pesar de ser procesos en los que se produce una

desestabilización de la membrana. En el caso de la inducción de la reacción acrosómica con un ionóforo se produce la entrada de calcio por la acción del antibiótico provocando una respuesta que es diferente entre los individuos y que depende principalmente de la composición lípida de la membrana del espermatozoide (Watson et al., 1991). Por otra parte, cuando tiene lugar la disminución de la temperatura durante el proceso de congelación se produce un aumento de permeabilidad de la membrana entrando calcio en su interior (Robertson y Watson, 1986; Robertson y Watson, 1987; Bailey y Buhr, 1993). Este aumento de la permeabilidad se debe a la fase de transición de los lípidos durante la cual se produce una desorganización de los mismos (de Leeuw et al., 1990). Sin embargo, durante la criopreservación los eventos más importantes que se producen están principalmente relacionados con los cambios osmóticos (Amann, 1999), estando la resistencia a la congelación de las células espermáticas muy relacionada con la resistencia al estrés osmótico y éste último hecho en estrecha relación con la permeabilidad de la membrana del espermatozoide (Curry y Watson, 1994; Curry et al., 1995; Gilmore et al., 1996; Noiles et al., 1997). Sin embargo, la resistencia a un estrés osmótico también se encuentra muy relacionada con la forma de la célula espermática (Watson et al., 1992). De este modo, Thurston et al. (2001) observaron que el tamaño de la cabeza de determinadas subpoblaciones espermáticas presenta relaciones positivas y negativas con los valores obtenidos a la descongelación, lo cual sugiere que la determinación del tamaño de la cabeza de los espermatozoides de una muestra y la determinación de distintas subpoblaciones en función de este parámetro, puede ser una herramienta útil para predecir la resistencia a la congelación. Finalmente, es posible que existan diferentes subpoblaciones de espermatozoides en las muestras espermáticas que respondan de forma distinta a ambos procesos (inducción de la reacción acrosómica y criopreservación) y que al tratarlas como un todo se pierda cualquier tipo de relación.

A.6. Relación entre la calidad seminal evaluada después de una prueba de resistencia térmica y la “congelabilidad global”

Las pruebas de resistencia térmica se realizan con el objeto de estimar la supervivencia de los espermatozoides en condiciones similares a la del tracto reproductivo de la hembra (Baril et al., 1993). La mayoría de estos test se suelen realizar con semen descongelado y a una temperatura de 37-38°C y desde 2 hasta incluso 7 h (Fiser et al., 1991; Baril et al., 1993; Ortiz, 1999; Peña et al., 2000). En este experimento se incubaron las muestras espermáticas frescas a 42°C durante 2 h puesto que al tratarse de material espermático fresco y por lo tanto con una alta calidad se necesita un estrés térmico mayor a aquel producido por una temperatura similar a la temperatura corporal, como puede ser 37 o 38°C. Por otra parte, Fiser, et al. (1991) determinaron que incubando semen descongelado a temperaturas más altas (42,5°C) se puede acortar el tiempo hasta una tercera parte con respecto a las pruebas de incubación clásicas que utilizan temperaturas menores.

Después de realizar el test de resistencia térmica se observó que, la movilidad resiste menos que la integridad del acrosoma, conservándose al final del proceso de incubación aproximadamente un 50% de espermatozoides móviles y un 84% de acrosomas normales. Tras el análisis de regresión múltiple se advirtió que las variables que explicaron de forma significativa la CG fueron la resistencia térmica para la movilidad evaluada a los 60 y 180 min. Además, se evidenció que cuanto mayor fue la movilidad después de esta prueba mayor fue el valor de la CG. No existe ningún trabajo en ciervos en el que se ponga de manifiesto la relación entre la resistencia de las muestras seminales frescas a un estrés térmico y la CG. Por otra parte, se ha observado que el estrés que produce la incubación de los espermatozoides a altas temperaturas da lugar a la desestabilización de las membranas produciéndose la reacción acrosómica de forma espontánea (Fleming y Kuehl, 1985; Watson et al., 1991). Del mismo modo, las bajas temperaturas aumenta la permeabilidad de la

membrana por una separación de fases de los lípidos (de Leeuw et al., 1990). Este aumento de la permeabilidad permite la entrada de determinados iones, como el calcio, acortándose el tiempo de supervivencia celular (Robertson y Watson, 1986; Harrison, 1996). Por lo tanto, al someter a las muestras espermáticas a altas temperaturas o a procesos de criopreservación, las membranas de los espermatozoides se desestabilizan aumentando la permeabilidad de las mismas y entrando una gran cantidad de calcio al interior de la célula provocando eventos similares a la reacción acrosómica.

Por otra parte, las variables de resistencia térmica para la movilidad evaluadas a los 60 y 120 min explicaron de forma débil la CG lo que significa que dicha relación no es muy fuerte. Por ello, es posible que la movilidad medida después de una incubación a altas temperaturas no sea un buen indicador de la resistencia a la congelación para esa muestra y que el daño producido a los espermatozoides que dan lugar a una disminución de la movilidad después de una prueba de resistencia térmica sea diferente al que se produce después de la congelación, teniendo que utilizar otras pruebas de evaluación de la calidad seminal más relacionadas con la crioresistencia. Igualmente y como se ha comentado anteriormente, es probable que existan diferentes subpoblaciones de espermatozoides en las muestras espermáticas con distintas sensibilidades a ambos procesos y que al tratarlas como un todo se pierda cualquier tipo de relación.

B. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS AL MACHO SOBRE LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA

B.1. Efecto del mes de obtención de las gónadas sobre la congelabilidad espermática

El efecto del mes se estudió puesto que la mayoría de los ungulados presentan un periodo de estacionalidad reproductiva, disminuyendo por lo tanto la calidad seminal fuera del periodo reproductivo y pudiendo por lo tanto afectar también a la resistencia a la congelación (Haigh et al., 1984; Haigh et al., 1985; Gosch y Fischer, 1989; Ciereszko et al., 2000).

Durante los meses de enero y febrero los valores para la mayoría de las tasas de resistencia térmica fueron menores que en octubre, noviembre y diciembre. Por otra parte, los mayores valores medios para la CG se obtuvieron en los meses de noviembre y diciembre, en relación con los de los meses de octubre, enero y febrero. Excepto para el mes de octubre se observó que los valores más bajos correspondieron a los meses de fotoperiodo creciente.

En ciervos no existe ningún trabajo en el que se haya estudiado la resistencia a la congelación en función de los diferentes meses del año. Sin embargo, el efecto de la estación sobre la congelabilidad ha sido estudiado por diferentes autores en otras especies. De este modo, Fiser y Fairfull (1983) observaron en moruecos a los que se les recolectó semen durante un año que la resistencia a la congelación para la movilidad obtuvo los valores más bajos durante el invierno y la primavera, siendo mínimos en los meses de abril y mayo. Posteriormente, estos mismos autores (Fiser y Fairfull, 1986) reportaron resultados muy similares para esta misma

especie, encontrando que el semen es más resistente a la congelación cuando se obtiene y congela en fotoperiodo decreciente. Por otra parte, en bovino (Ibrahim et al., 1983) y búfalo (Bahga y Khokar, 1991) la resistencia a la congelación es mayor durante las estaciones de otoño-invierno que en verano. Además, la fertilidad es menor para el semen de ovino recolectado y congelado fuera de la época reproductiva, indicando esto una menor resistencia a la congelación de estas muestras (Colas, 1979). Por último, Park y Yi (2002) observaron en cerdos que los valores de la movilidad y los acrosomas normales del semen congelado en primavera son mucho más altos que en el resto de las estaciones, aunque inicialmente no existieron diferencias en la calidad seminal para dichas estaciones, coincidiendo este hecho con la máxima concentración de testosterona en sangre. Aunque, no existe en la literatura ningún trabajo en el ciervo ibérico en el que se haya medido el perfil de secreción de testosterona a lo largo de los diferentes meses, Lincoln (1971a, b) y Lincoln et al. (1970) han determinado en ciervo rojo que la concentración máxima de esta hormona se obtiene durante los meses de septiembre a octubre, disminuyendo los valores desde noviembre y siendo prácticamente indetectables a partir de abril. Estos cambios en la secreción de testosterona van relacionados de la misma manera con modificaciones en la espermatogénesis. Así, en diferentes especies de ungulados se ha puesto de manifiesto que el tamaño de las células de Leydig y del núcleo de las células de Sertoli están aumentados durante los días cortos así como, la producción espermática, y dichos cambios se relacionaron de forma positiva con la concentración de testosterona (Hochereau-de Reviers y Lincoln, 1978; Hochereau-de Reviers et al., 1985). Por lo tanto, es posible que en el ciervo ibérico las concentraciones de testosterona fluctúen de manera similar a lo reportado por Lincoln en ciervo rojo. De este modo, el periodo en el cual las concentraciones de testosterona son mayores para otras subespecies de ciervos, coincide con el espacio de tiempo en el que la resistencia a la congelación es mayor para las muestras espermáticas procedentes de ciervo ibérico.

Así, durante los meses de fotoperiodo decreciente es cuando la concentración de esta hormona es más elevada en estas especies de ungulados, coincidiendo con el momento en el que se obtienen los mejores valores de resistencia a la congelación en el ciervo ibérico. La síntesis de determinadas proteínas epididimarias depende de la presencia de andrógenos y muchas de ellas remodelan la membrana del espermatozoide, resultando imprescindibles para que los mismos lleven a cabo su función (Brooks y Higgins, 1980; Cooper, 1998/1999; de Pauw et al., 2003). Al mismo tiempo, cuando disminuye la síntesis de andrógenos también lo hacen los niveles de receptores de andrógenos en las células epididimarias (Zhu et al., 2000). Estos receptores son imprescindibles para que los andrógenos puedan llevar a cabo su función. De este modo, es probable que cuando las concentraciones de testosterona comienzan a disminuir se altere la secreción de determinadas proteínas que dependen de la secreción de esta hormona. Además, Yeung et al. (1999) sugieren que algunos factores epididimarios presentes en el lumen pueden ser los responsables de que los espermatozoides adquieran su capacidad para regular el volumen después de producirse cambios osmóticos. Si la presencia de estos factores también depende de la concentración de andrógenos, es posible obtener espermatozoides con fallos para regular los cambios de volumen y por lo tanto ser más sensibles a un proceso como el de la criopreservación, en el que se producen cambios de volumen, durante el periodo en el que la concentración de testosterona comienza a disminuir.

Las causas por las que la resistencia a la congelación se encuentra disminuida durante el mes de octubre pueden ser diferentes a las de los meses de enero y febrero, ya que este mes corresponde a fotoperiodo decreciente y en esta época las concentraciones de testosterona deben ser altas. Así, durante esta época del año es cuando tienen lugar los apareamientos y por lo tanto hay una mayor actividad sexual, pudiendo dar lugar a que la frecuencia entre eyaculaciones se encuentre acortada. Este hecho puede hacer posible que los espermatozoides tengan menos tiempo para madurar en el epidídimo, alterandose determinadas características de

los mismos y siendo más sensibles a cualquier estrés como por ejemplo el producido por la congelación. En otras especies se ha demostrado que una alta frecuencia de recogidas afecta de forma negativa a distintas características seminales (Bonet et al., 1993; Ollero et al., 1996; Shamsuddin et al., 2000). Igualmente, Strzezek et al. (1995) observaron que después de una alta frecuencia de eyaculación se produjeron cambios en la estructura del acrosoma y de la pieza intermedia de los espermatozoides que proporcionaron una menor resistencia de la membrana al choque frío. Al mismo tiempo, Kaya et al. (2002) sugieren que una alta frecuencia de eyaculación da lugar a una inadecuada maduración de los espermatozoides en el epidídimo establecido por la presencia de determinadas enzimas (aspartato aminotransferasa y GPT) indicativas de daño celular. Finalmente, Preston et al. (2001) han observado que la alta frecuencia de eyaculación durante la época reproductiva en el morueco produce una disminución de las reservas espermáticas al mismo tiempo que un aumento de las morfoanomalías espermáticas en el eyaculado. Por lo tanto, es posible que las células espermáticas obtenidas en este mes del año, momento en el que los animales presentan una alta actividad sexual, sean más sensibles a un estrés como el producido por la congelación probablemente por ser células con mayor grado de inmadurez.

B.2. Efecto de los parámetros intrínsecos al macho sobre la congelabilidad espermática

Como se ha demostrado en diversos trabajos dentro de una misma especie existen variaciones individuales con respecto a la resistencia a la congelación espermática (Medrano, 1998; Medrano et al., 2002). Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se haya puesto de manifiesto si determinadas características de los individuos influyen sobre la congelabilidad espermática, pudiendo ser algunas de ellas las responsables de las diferencias individuales. Por ello, en este trabajo hemos evaluado como afectan determinadas características intrínsecas al macho como la

edad, la variabilidad genética, la condición corporal y el grado de estrés sobre la resistencia espermática a la congelación.

Los resultados obtenidos de las características intrínsecas al macho mostraron, que la condición corporal estimada mediante el índice de grasa renal, fue menor para el ciervo ibérico (19%) en comparación con el valor medio alcanzado en ciervo rojo (46%) (Riney, 1955). Igualmente, el peso de las adrenales fue menor en nuestro estudio que en aquel realizado por Lincoln (1971). Por último, la d^2 media reportada para ciervo rojo por Coulson et al. (1998) osciló entre $\cong 5$ y 128, mientras que el rango obtenido para los ciervos de este estudio se encontró entre $\cong 3$ y 328.

En este experimento se estudió el efecto de los parámetros intrínsecos al macho sobre la congelabilidad global, solamente en los meses de noviembre y diciembre puesto que no existieron diferencias para la CG entre dichos meses. Por otra parte, las correlaciones representadas en la Tabla 17 entre los parámetros intrínsecos al macho muestran la independencia de estas variables. De este modo, los efectos observados sobre la congelabilidad global de una variable se deberán exclusivamente a ella y no a efectos del resto de las variables o del mes de obtención de las muestras.

La edad se relacionó de forma negativa con las tasas de resistencia a la congelación CRMI, CRE+, siendo la relación con las variables CRNAR y CREV positiva. Por otra parte, la edad no mostró una relación significativa con la CG. Otros autores sin embargo si han observado diferencias en la congelación en función de la edad. Así, Kosiniak y Bittmar (1987) y Karabinus et al. (1990) observaron en caballo y toro, respectivamente que a mayor edad los valores de calidad seminal obtenidos a la descongelación fueron superiores. Sin embargo, en los estudios anteriores los animales evaluados tenían como máximo una edad de 4 años, no testando machos de mayor edad. Contrariamente a estos autores, Abaigar et al. (1999) encontraron una relación negativa entre la presencia a la descongelación

de una subpoblación espermática con un movimiento descoordinado y la edad de los animales utilizados, sugiriendo que el semen de los machos jóvenes y con una menor proporción de este tipo de espermatozoides, era menos sensible a la criopreservación. Por otra parte, Kumi-Diaka et al. (1981) observaron en toros de 7,5 a 12 años que la actividad espermatogénica estaba disminuida. En los animales de dicho estudio también se presentaron procesos degenerativos en testículos y epidídimo. Del mismo modo, Tanemura et al. (1993) observaron una degeneración testicular con la edad en ratones. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que los espermatozoides sintetizados tanto a edades jóvenes así como, cuando los animales son más adultos soportan bien un proceso como el de la criopreservación, a pesar de que en edades avanzadas se producen alteraciones degenerativas en los testículos que podrían afectar a la composición de las células espermáticas y por lo tanto a la resistencia a la congelación de las mismas.

Otra de las características intrínsecas al macho que se evaluó fue la d^2 media para explorar los efectos de la consanguinidad o el grado de exogamia sobre la resistencia a la congelación. Existen muchos estudios en los que se ha puesto de manifiesto que a mayor tasa de consanguinidad se obtienen peores valores de calidad seminal afectando por tanto al éxito reproductivo (Diarra et al., 1997; Roldan et al., 1998; Gomendio et al., 2000; Margulis y Walsh, 2002). Además, algunos autores han observado en determinadas líneas de ratones emparentadas una baja resistencia a la congelación espermática (Nakagata y Takeshima, 1993; Songsasen y Leibo, 1997; Sztejn et al., 2000). Por otra parte, la resistencia a la congelación de las células espermáticas parece que está determinada genéticamente mediante la adquisición por parte del espermatozoide de determinadas peculiaridades como las referidas a la permeabilidad de la membrana o a la morfometría (Thurston et al., 2001; Thurston et al., 2002a).

En este trabajo la d^2 media se relaciona de forma negativa con todas las tasas de resistencia a la congelación, excepto con la CRMI. Una vez realizado el análisis de regresión múltiple se observó que existe una relación negativa entre la d^2 media y la CG. De este modo, cuanto mayores fueron los valores de la d^2 media menores fueron los valores para la resistencia a la congelación. Cuando los valores de la d^2 media son cercanos a 0 significa que los gametos que originaron a ese individuo se encuentran más emparentados y con mayor probabilidad de experimentar las consecuencias de la consanguinidad. Sin embargo, si los valores de la d^2 media son altos es más probable que el individuo proceda de individuos de poblaciones divergentes y que experimente heterosis (Coulson et al., 1999). A diferencia de los ciervos estudiados por Coulson et al. (1998) donde los valores máximos de la d^2 media se acercaron a 128, en el ciervo ibérico el valor máximo alcanzado utilizando los mismos microsatélites fue de 328. Esto puede ser debido a que exista un cruzamiento del ciervo ibérico con otras subespecies con el objeto de mejorar determinadas características productivas, como la cuerna, y por lo tanto exista un mayor grado de exogamia. Por otra parte, no consta en la literatura ningún trabajo en el que se haya puesto de manifiesto la relación entre el grado de exogamia y la resistencia a la congelación. Sin embargo, otros autores han encontrado una asociación con otras variables indicativas de *fitness* y el grado de exogamia (Coulson et al., 1998; Coulson et al., 1999; Marshall y Spalton, 2000).

Cuando se producen cruces entre individuos muy emparentados se origina un aumento de la homocigosidad y consecuentemente es posible la *depresión por endogamia*. Por el contrario el apareamiento entre individuos muy divergentes da lugar a un incremento de la heterocigosidad aumentando el vigor híbrido y afectando de forma positiva a determinadas características indicativas de *fitness*. De este modo, algunas características como la supervivencia al nacimiento, están favorecidas por el vigor híbrido (Coltman et al., 1998; Coulson et al., 1998). Sin embargo, también es posible que los cruces entre individuos no emparentados produzcan una

progenie con una menor viabilidad y fecundidad dando lugar a lo que se denomina *depresión por exogamia*. Así, Coulson et al. (1999) observaron una relación negativa entre la d^2 media y la supervivencia de los gabatos durante el primer invierno, sugiriendo una asociación inversa entre el grado de exogamia y la supervivencia al nacimiento de los gabatos. Del mismo modo, Marshall y Spalton (2000) también encontraron en oryx una relación negativa entre la d^2 media y la supervivencia juvenil, interpretando dicha relación como una depresión por exogamia. Los híbridos pueden tener un bajo *fitness* comparado a las generaciones anteriores debido a varias causas. En primer lugar puede presentarse una dilución de los genes asociados con adaptaciones locales. En segundo lugar la ventaja de un alelo puede depender de la presencia de otros alelos en otros loci y al mezclarse dos poblaciones divergentes puede resultar en una disrupción de complejos de genes coadaptados (Templenton, 1986). Así, en estudios realizados con diferentes subespecies de toros se ha observado que al cruzar una de ellas que está adaptada al medio con otra no adaptada se obtiene una progenie con unas peores características reproductivas (Chacón et al., 1999). Por lo tanto, es posible que los ciervos con un valor de la d^2 media muy alto procedan de cruces de poblaciones muy divergentes y que se obtengan de los mismos, espermatozoides más sensibles a cualquier estrés, como por ejemplo el de la congelación.

Por otra parte, para determinar la condición corporal de los ciervos se utilizó un índice indicativo de esta característica denominado índice de grasa renal. Este índice está relacionado con la cantidad de grasa abdominal (Riney, 1955). La relación encontrada en este trabajo entre el índice de grasa renal y las tasas de resistencia a la congelación fue negativa para todas las tasas. Por otra parte, cuando el índice de grasa se introdujo en un análisis de regresión con otros parámetros que podían afectar a dicha variable, se observó que el índice de grasa renal influyó de forma negativa y significativa sobre la CG. Así, cuanto mayor fue el índice de grasa renal peor fue la resistencia a la congelación. No existe en la literatura ningún trabajo en el que se haya estudiado la relación entre la condición corporal y

la resistencia a la congelación del semen. Sin embargo, en determinados estudios se ha investigado el efecto de la condición corporal sobre la reproducción, existiendo una relación directa entre la condición corporal y el patrón de secreción de determinadas hormonas sexuales. Así, se ha puesto de manifiesto una correlación negativa entre las concentraciones de testosterona y los esteroides adrenales con la deposición de grasa abdominal y con la grasa corporal (Tchernof et al., 1995; Tchernof et al., 1997; Bray, 1997; Pritchard et al., 1998; Tan y Pu, 2002). Además, en la especie humana, se ha demostrado que tras la sobrealimentación se produce un aumento de la grasa corporal correlacionado con una disminución de la concentración de testosterona, incluso aunque los individuos se encuentren dentro de un rango de peso normal (Tchernof et al., 1997; Pritchard et al., 1998). También se ha demostrado, que la testosterona tienen una acción lipolítica al inhibir la entrada de lípidos en los adipocitos y la actividad de la lipoproteína-lipasa (enzima que regula la entrada de triglicéridos en el interior de los adipocitos) y al incrementar los receptores beta-adrenérgicos (receptores imprescindibles para llevar a cabo la lipólisis) (Xu et al., 1991; de Pergola, 2000). Incluso, tras la administración de testosterona a hombres se ha demostrado una disminución de la grasa visceral (Marin et al., 1996). Del mismo modo, en la especie humana se ha observado que los pacientes más obesos tienen una menor amplitud de los pulsos de LH y menores concentraciones de testosterona (Vermeulen et al., 1993). Por lo tanto y en relación a lo anterior, es posible que los machos evaluados en este trabajo con un mayor índice de grasa renal tuvieran concentraciones menores de testosterona, pudiendo este hecho influir sobre la resistencia a la congelación de los espermatozoides sintetizados en ese ambiente.

Por último, se observó que el tamaño de las adrenales influyó de forma significativa sobre la congelabilidad global. Esta relación fue negativa de forma que a mayor tamaño de las glándulas adrenales peor fue la congelabilidad. Del mismo modo, la relación entre el peso de las adrenales y las tasas de resistencia a la congelación también fue negativa. Durante la

época reproductiva de los ciervos, las interacciones entre los machos por el dominio de las hembras son mayores, y es posible un aumento del estrés. Así, en otras especies de animales se ha demostrado que las luchas para ocupar un rango jerárquico en una estructura social genera un aumento de las hormonas indicativas de estrés (Conner et al., 1971; Creel et al., 1996; Hardy et al., 2002). Por otra parte, el estrés crónico durante un tiempo prolongado produce un aumento del peso de las glándulas adrenales (Christian et al., 1960; Shively y Kaplan, 1984). De este modo, se ha observado que la administración diaria de ACTH produce en ratas un aumento del peso de las glándulas adrenales (Pignatelli et al., 2002). Para determinar el grado de estrés en este estudio evaluamos el peso de las glándulas adrenales. El mayor peso de estas glándulas se debe a un efecto del estrés puesto que esta variable no estuvo correlacionada con determinados parámetros indicativos de tamaño corporal (datos no mostrados). Por otra parte, en la literatura no existe ningún estudio en el que se haya puesto de manifiesto la relación entre el grado de estrés y la resistencia a la congelación del semen. Sin embargo, otras investigaciones han observado el efecto negativo del estrés sobre la reproducción. Así, se ha demostrado que, tanto el estrés agudo como el crónico producen una disminución de la LH y la testosterona (McGrady, 1984; Juniewicz et al., 1987; Demura et al., 1989; Norman, 1993). Por otra parte, Hardy et al. (2002) demostraron la presencia de receptores para corticoides en las células de Leydig, pudiendo inhibirse la esteridogénesis por la acción de estas hormonas. Estas células poseen unas enzimas que inactivan a los corticoides. Sin embargo, cuando el estrés es alto se supera la capacidad oxidativa de estas enzimas dando lugar a una reducción de las concentraciones de testosterona. Por lo tanto, cuando el nivel de estrés en los ciervos evaluados en este trabajo, medido mediante el tamaño de las glándulas adrenales, fue muy alto, las concentraciones de testosterona pudieron estar disminuidas. Este hecho pudo influir sobre la composición del espermatozoide y obtenerse células espermáticas más sensibles a un proceso como el de la congelación.

En resumen, los animales con unos mayores depósitos de grasa renal y un mayor grado de estrés, pueden tener menores concentraciones de testosterona como se ha mencionado anteriormente. Al igual que la hipótesis que se expuso para los resultados obtenidos en función del mes en el que se recogieron las muestras espermáticas, una menor concentración de esta hormona puede dar lugar a la ausencia de determinadas proteínas que pueden ser esenciales para regular los cambios de volumen en los espermatozoides y por lo tanto para soportar un proceso como el de la criopreservación, basado principalmente en modificaciones del volumen celular.

CONCLUSIONES

1. La calidad seminal inicial disminuye después de un proceso de refrigeración-equilibración y congelación-descongelación. La característica seminal que menos se conserva después de un proceso de congelación es la funcionalidad de la membrana plasmática medida mediante un test hipoosmótico.
2. Los parámetros seminales iniciales que influyen de forma positiva sobre la congelabilidad global son: la concentración, el número total de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides móviles, la calidad del movimiento y el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en posición distal. El parámetro de calidad seminal inicial que influye de forma negativa sobre la congelabilidad global es el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal.
3. Los parámetros seminales después de un proceso de congelación-descongelación que influyen de forma positiva sobre la congelabilidad global son: el porcentaje de espermatozoides móviles, la calidad de movimiento, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, vivos y con una respuesta positiva al test-hipoosmótico.
4. Los parámetros de calidad seminal evaluados después de la criopreservación explican un mayor porcentaje de la variabilidad obtenida en la congelabilidad global que aquellos evaluados inicialmente.
5. Las variables ARI 5 y ARI 10 se relacionan de forma negativa con la congelabilidad global, explicando ligeramente la variabilidad observada en esta última variable.

6. Las variables RTMI 60 y RTMI 120 se relacionan de forma positiva sobre la congelabilidad global, explicando débilmente la variabilidad observada en este último parámetro.
7. Los valores de la CG fueron mayores en los meses de noviembre y diciembre que en los de octubre, enero y febrero.
8. De los parámetros intrínsecos al macho evaluados, la variabilidad genética medida por medio de la d^2 media, la condición corporal y el grado de estrés medidos respectivamente por el índice de grasa renal y el peso de las adrenales, afectan de forma negativa a la CG. Sin embargo, la edad no tiene ninguna influencia sobre dicha variable.

BIBLIOGRAFÍA

Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt W. 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazelle dama mhor*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction* 122:265-273.

Abaigar T, Holt W, Harrison R, Barrio G. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* 60:32-41.

Aguado M, Garde JJ, Perez-Guzman M, Montoro V, Vázquez I. 1994. Variaciones estacionales de la criorresistencia del semen de morueco manchego. XIX jornadas científicas de la SEOE, Burgos. pp 507-509.

Aitken RJ. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fert Dev* 7:659-668.

Alvarez JG, Storey BT. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13:232-241.

Amann RP. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 2:37-58.

Amann RP. 1988. Maturation of spermatozoa. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin. pp 320-328.

Amann RP. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 10:89-98.

Amann RP. 1999. Cryopreservation of semen. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E, Neill JD, (Eds). Academic Press. pp 773-783.

Amann RP, Almquist JO. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls-VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. *J Reprod Fert* 3:260-268.

Amann RP, Hammerstdt RH. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. J Adrol 14:397-405.

Amann RP, Hay SR, Hammerstdt RH. 1982. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. Biol Reprod 27:723-733.

Anel, L, Garde JJ, Boixo JC, Ortiz N, Anel E, García A, Martínez F, López-Sáez A, Alvarez M, Soler AJ. 1999. Recogida seminal en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus ibericus*): Valoración de la técnica de electroeyaculación. VIII Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. Vol extra 20:624-626.

Anel L, García A, Martínez F, Soler AJ, Anel E, López-Sáez A, Alvarez M, Boixo JC, Paz P, Garde JJ. 2001. Evaluación preliminar de la edad como factor de variación en la electroeyaculación del ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). IX Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. Vol extra 22:820-822.

Argo C, Jabbour HN, Goddar P, Webb R, Loudon A. 1994. Superovulatin in red deer (*Cervus elaphus*) and Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) and fertilization rates following artificial insemination with Père David's deer. J Reprod Fert 100:629-636.

Asher G. 1998. Artificial breeding technologies for farmed deer. Proc 2nd World Deer Farming Congress. Irlanda. pp 161-170.

Asher G, Berg D, Evans G. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. Anim Reprod Sci 62:195-211.

Asher G, Monfort S, Wemmer C. 1999. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. J Reprod Fert Suppl 54:143-156.

Asher G, Adam J, James R, Barnes D. 1988. Artificial insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*): fixed-time insemination at a synchronized oestrus. Anim Prod 47:487-492.

Asher G, Berg D, Beaumont S, Morrow CJ, O'Neill KT, Fisher M. 1996. Comparasion of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama dama*) and hybrid Mesopotamian x European fallow deer (*D. d. mesopotamica* x *D. d. dama*). Anim Reprod Sci 45:201-216.

Asher G, Fisher M, Fennessy PF, Mackintosh H, Jabbour HN, Morrow C. 1993. Oestrous synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). Anim Reprod Sci 33:241-265.

Axnér E, Ström Holst B, Linde-Forsberg C. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparision with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. Theriogenology 50:973-979.

Bahga CS, Khokar BS. 1991. Effect of different seasons on concentration of plasma luteinizing hormone and seminal quality vis-a-vis freezability of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). Int J Biometeorol 35:222-224.

Bailey JL, Buhr M. 1993. Ca²⁺ regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187. Cryobiology 30:470-481.

Bailey JL, Buhr MM. 1995. Regulation of internal Ca²⁺ by chilled bull and boar spermatozoa. Cryobiology 32:259-269.

Ball BA, Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. J Androl 22:1061-1069.

Ballou JD. 1992. Potential contribution of cryopreserved germplasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. Cryobiology 28:19-25.

Baril G, Chemineau P, Cognie Y, Guerin Y, Befouef B, Orgeur P, Vallet J. 1993. Manuel de formation pour l'insemination artificielle ches les ovins et les caprins. FAO. 231 pp.

Bartos L, Perner V. 1998. Distribution of mating across season and reproductive success according to dominance in male red deer. *Folia Zool* 47:7-12.

Barrios B, Perez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA. 2001. Influencia de la estacionalidad en la composición del plasma seminal ovino. IX Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. Vol extra 22:844-846.

Barth AD, Oko RJ. 1989. Defects of the sperm tail. In: Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. pp 214-270.

Bearden HJ, Fuquay JW. 1997. Semen processing, storage, and handling. In: Applied animal reproduction. Prntice-Hall. pp 171-190.

Beck WW, Silverstein I. 1975. Variable motility recovery of spermatozoa following freeze preservation. *Fert Steril* 26:863-867.

Berger T. 1996. Fertilization in ungulates. *Anim Reprod Sci* 42:351-360.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 55:282-288.

Blanco, O. 1998. Análisis objetivo de la motilidad espermática: Evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 170 pp.

Blash S, Melican D, Gavin W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54:899-905.

Bonet S, Briz MD, Fradera A. 1993. Estudio comparativo entre la morfología espermática del eyaculado de verracos sometidos a extracciones de semen cada dos días y la morfología del esperma procedente de las tres regiones del epidídimas. *Anaporc* 194:30-38.

Braun J, Sakai M, Hochi S, Oguri N. 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41:809-818.

Bray GA. 1997. Obesity and reproduction. *Hum Reprod* 12:26-32.

Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues L, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. 2002 (a). Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology* 58:1175-1186.

Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues L, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. 2002 (b). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci* 70:181-190.

Brooks DE, Higgins SJ. 1980. Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid spermatozoa in the rat epididymis. *J Reprod Fert* 59:363-375.

Buhr MM, Fiser P, Bailey JL, Curtis, EF. 2001. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Androl* 22:961-969.

Chacón J, Pérez E, Müller E, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 1999. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. *Theriogenology* 52:221-231.

Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 59:451-458.

Check JH, Check ML, Katsoff D. 2002. Prognosis for sperm fertilizability: analysis of different variables in men. *Arch Androl* 48:73-83.

Christian JJ, Flycer V, Davis DE. 1960. Factor in the mass mortality of a herd Sika deer, (*Cervus Nippon*). *Chesapeake Sci* 1:79-95.

Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J. 2000. Effect of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim Reprod Sci* 64:89-96.

Colas G. 1979. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. *Livest Prod Sci* 6:153-166.

Coltman DW, Don Bowen W, Wright JM. 1998. Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positive correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proc R Soc Lond B* 265:803-809.

Comizzoli P, Mauget R, Mermillod P. 2001. Assesment in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* 56:261-274.

Comizzoli P, Mermillod P, Cognie Y, Legendre X, Mauget R. 2000. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 55:649-659.

Conner RL, Vernikos-Danellis J, Levine S. 1971. Stress, fighting and neuroendocrine function. *Nature* 234:564-566.

Cooper TG. 1998. Interactions between epididymal secrections and spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* 53:119-136.

Cooper TG. 1999. Epididymes. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). Academic Press. Vol 4:1-17.

Correa JR, Zavos PM. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42:351-360.

Corteel J. 1975. Production du sperme chez le bouc: variation saisonniere de la quantite et de la qualite du sperme recolte selon l'age des animaux. *C R Jour Rech Ovine, Caprine*. Paris. pp 1-13.

Coulson TN, Albon SD, Slate J, Pemberton JM. 1999. Microsatellite loci reveal sex-dependent responses to inbreeding and outbreeding in red deer calves. *Evolution* 53:1951-1960.

Coulson TN, Pemberton JM, Albon SD, Beaumont M, Marshall TC, Slate J, Guinness FE, Clutton-Brock TH. 1998. Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proc R Soc Lond B* 265:489-495.

Courtens HE, Paquignon M, Ploen L. 1989. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J Reprod Fert* 87:613-626.

Creel S, Creel NM, Monfort SL. 1996. Social stress and dominance. *Nature* 379:212.

Critser J, Arneson B, Aaker D, Huse-Benda A, Ball D. 1987. Cryopreservation of human spermatozoa.II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fert Steril* 47:980-984.

Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann (1991). A test of human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 12:98-103.

Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *J Reprod Fert* 5:46-52.

Curry MR, Watson PF. 1994. Osmotic effects on ram and sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31:39-46.

Curry MR, Millar JD, Watson PF. 1994. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol Reprod* 51:1014-1021.

Curry MR, Redding BJ, Watson PF. 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology* 32:175-181.

Darin-Bennet A, White I. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14:466-470.

de Lamirande E, Gagnon C. 1992 (a). Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 13:368-378.

de Lamirande E, Gagnon C. 1992 (b). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosin triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 13:379-386.

de Leuw A, Den-Daas J, Woelders H. 1991. The fix-vital stain method; simultaneous determination of viability and the acrosomal status of bovine spermatozoa. *J Androl* 12:112-118.

de Leeuw FE, Chen H, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27:171-183.

de Pauw IMC, Goff AK, Van Soom A, Verberckmoes S, de Kruif A. 2003. Hormonal regulation of bovine secretory proteins derived from caput and cauda epididymal epithelial cell cultures. *J Androl* 24:401-407.

de Pergola G. 2000. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:s59-63.

Demura R, Suzuki T, Nakamura S, Komatsu H, Odagari E, Demura H. 1989. Effect of immobilization stress on testosterone and inhibin in male rats. *J Androl* 10:210-213.

Diarra MS, Paré JP, Roy G. 1997. Facteurs génétiques et environnementaux affectant la qualité de la semence de jeunes taureaux Holstein. *Can J Anim Sci* 77:77-85.

Dott H, Utsi M. 1971. The collection and examination of semen of Reindeer (*Rangifer tarandus*). *J Zoo Lond* 164:419-424.

Drevius LO, Eriksson H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res* 42:136-156.

Drobnis E, Crowe L, Berger T, Anchordoguy T, Overstreet J, Crowe J. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a desmostration using sperm as model. *J Exp Zool* 265:432-437.

Eliasson R. 1981. Analysis of semen. In: *The testis*. Burger H, de Kretser D (Eds). Raven Press. pp 381-399.

Evans G, Maxwell W. 1989. Manejo y valoración del semen. En: *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Acribia. pp 95-107.

Fennesy PF, Mackintosh CG, Shackell GH. 1990. Artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Anim Prod* 51:613-621.

Fennessy PF, Asher G, Beatson NS, Dixon TE, Hunter JW, Bringans MJ. 1994. Embryo transfer in deer. *Theriogenology* 41:133-138.

Fernandes PA, McCoshen JA, Math MC, Kredentser JV, Wodzicki AM. 1990. Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. *Fert Steril* 54:322-327.

Fiser P, Fairfull R. 1983. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Cryobiology* 20:684-689.

Fiser P, Fairfull R. 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* 21: 542-551.

Fiser P, Fairfull R. 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23:518-524.

Fiser P, Fairfull R. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26:64-69.

Fiser P, Fairfull R. 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar ram spermatozoa frozen in 0,5 ml straws. *Mol Reprod Dev* 25:123-129.

Fiser P, Hansen C, Underhill L, Marcus G. 1991. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 28:454-459.

Fiser P, Fairfull R, Hansen C, Panichi P, Shrestha J, Underhill L. 1993. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol Reprod Dev* 28: 454-459.

Fleming AD, Kuehl TJ. 1985. Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 233:405-411.

Foote RH, Seidel GE, Hahn J, Berndtson WE, Coulter GH. 1976. Seminal quality, spermatozoal output, and testicular changes in growing holstein bulls. *J Dairy Sci* 60:85-88.

Fraser L. 1995. Ionic control of sperm function. *Reprod Fert Dev* 7:905-925.

Friedmann Y, MacMallum C, Killian I, Grobler DG, Denniston R. 1999. Changes in motility and morphological characteristics of african buffalo (*Syncerus caffer*) sperm during storage of epididymis. *Theriogenology* 51:332.

Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Soffer Y, Ron-El. 2002. Factors influencing the outcome of ICSI in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: a comparative study. *Hum Reprod* 17:3114-3121.

Fukunaga N, Haigo K, Kyono K, Araki Y. 2001. Efficiency of using frozen-thawed testicular sperm for multiple intracytoplasmic sperm injections. *J Assist Reprod Genet* 18: 634-637.

Gao D, Liu J, McGann L, Watson PF, Kleinhans F, Mazur P, Critser E, Critser E. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10:1109-1122.

García A, Landete-Castillejos T, Garde JJ, Gallego L. 2002. Reproductive seasonality in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* 58:1553-1562.

Garde JJ. 1993. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. pp 137.

Garde JJ, García A, Ortiz N, Gallego L. 1996. Evaluación de espermatozoides obtenidos postmortem en el ciervo. *Doñana Acta Vertebrata* 33:229-241.

Garde JJ, García-Artiga C, Gutiérrez A, Vázquez I. 1992. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Medicina Veterinaria* 9:107-113.

Garde JJ, Ortiz N, García A, Gallego L. 1997 (a). Use of a triple stain technique to detect viability and acrosome reaction in deer spermatozoa. *Arch Androl* 39:1-9.

Garde JJ, Perez-Guzman M, Pérez SS, Montoro V. 1997 (b). Ionophore-induced acrosome reaction in ram spermatozoa: a possible test in the diagnosis of male subfertility. *Arch Zootec* 46:43-49.

Garde JJ, García-Díaz AJ, Ortiz N, López-Sáez A, Soler AJ, Gallego L. 1999 (a). Técnicas de reproducción asistida aplicadas a poblaciones cinegéticas de cérvidos. II Congreso ibérico de Reproducción Animal. Lugo. pp 419-428.

Garde JJ, Ortiz N, García A, Gallego L, Landete-Castillejos T, López-Sáez A. 1998. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Androl* 41:195-202.

Garde JJ, Anel E, López-Sáez A, Boixo JC, Ortiz N, Martínez F, Alvarez M, Gallego L, Anel L. 1999 (b). Electroeyaculación en el ciervo ibérico (*Cervus Elaphus Hispanicus*): Características espermáticas. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Lugo. pp 476-478.

Garde JJ, Soler AJ, Casinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS. 2003. Sperm Cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella Cuvieri*, *G. dama mhorrr*, *G. dorcas neglecta*). Biol Reprod 69:602-611.

Garde JJ, Anel E, García A, Boixo JC, Soler AJ, de Paz P, López-Sáez A, Guerra C, Anel L. 2000. Evaluation of two glycerol concentrations in freezing electroejaculates and epididymal spermatozoa from iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). 14th International Congress of Animal Reproduction. Estocolmo. pp 142.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE. 1997. Fuorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biol Reprod 57:1401-1406.

Gilmore J, Junying Du, Jun Tao, Peter AT, Critser J. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. J Reprod Fert 107:87-95.

Gizejewski Z, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. 1998. Post-mortem examination of genital organs and characteristics of epididymal spermatozoa from wild red deer stags *Cervus elaphus carpaticus* var. *montanus*. Proc 2nd World Conf Mt Ungulates. pp 121-128.

Gomendio M, Cassinello J, Roldan ERS. 2000. A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. Proc R Soc Lond B 267:875-882.

Gosch B, Fischer K. 1989. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer (*Dama dama*) and their relationship to the antler cycle. J Reprod Fert 85:7-17.

Graham E, Crabo BG, Pace M. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J Anim Sci 47:80-119.

Graham JK. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. Theriogenology 41:1151-1162.

Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. J Androl 19:704-709.

Gravance CG, Garner DL, Pitt C, Vishwanath R, Sax-Gravance SK, Casey PJ. 1999. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). Int J Androl 22:77-82.

Hafez ESE. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. Nueva editorial Interamericana. 694 pp.

Haigh JC. 1984. Artificial insemination of two white-tailed deer. JAVMA 185:1446-1447.

Haigh JC, Bowen G. 1991. Artificial insemination of red deer (*Cervus elaphus*) with frozen-thawed wapiti semen. J Reprod Fert 93:119-123.

Haigh JC, Barth AD, Bowman P. 1986. An evaluation of extenders for wapiti, *Cervus elaphus*, semen. J Zool An Med 17:129-132.

Haigh JC, Dradjat A, English A. 1993. Comparasion of two extenders for the cryopreservation of chital (*Axis axis*) semen. J Zoo Wildl Med 24:454-458.

Haigh JC, Barth AD, Cates WF, Glover GJ. 1985. Electro-ejaculation and semen evaluation of wapiti. R Soc N Z 22:197-203.

Haigh JC, Cates WF, Glover GJ, Rawlingst NC. 1984. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology fo male wapiti (*Cervus elaphus*). J Reprod Fert 70:413-418.

Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. 1999. Análisis multivariante. Prentice Hall Iberia. 799 pp.

Hammadeh ME, Georg T, Rosenbaum P, Schimdt W. 2001. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. *Andrología* 33:331-336.

Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schimdt W. 1999. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 22:155-162.

Hammadeh ME, Dehn CH, Hippach M, Zeginiadou T, Stieber M, Georg T, Rosenbaum P, Schimdt W. 2001. Comparasion between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterius effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *Int J Androl* 24:66-72.

Hammerstdt RH. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a Review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fert Dev* 5:675-690.

Hammerstdt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm:What we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.

Hardy MP, Sottas CM, Ge R, McKittrick CR, Tamashiro KL, McEwen BS, Haider SG, Markham CM, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR. 2002. Trends of reproductive hormones in male rats during psychosocial stress: role of glucocorticoid metabolism in behavioral dominance. *Biol Reprod* 67:1750-1755.

Harrison R. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fert Dev* 8:581-594.

Harrison R, Vickers E. 1990. Use of fluorescentprobes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 88:343-352.

Henry M, Noiles E, Gao D, Mazur P, Critser J. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fert Steril* 60:911-917.

Heuchel V, Schwartz D, Czyglik F. 1983. Between and within subject correlations and variances for certain semen characteristics in fertile men. *Andrología* 15:171-176.

Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller R, Braun J. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl* 22:104-110.

Hochereau-de Reviers MT, Lincoln GA. 1978. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J Reprod Fert* 54:209-213.

Hochereau-de Reviers MT, Perreau C, Lincoln GA. 1985. Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. *J Reprod Fert* 74:329-334.

Holt W 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fert Dev* 9:309-319.

Holt W. 2000 (a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.

Holt W. 2000 (b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.

Holt W. 2001. Germoplasm cryopreservation in elephants and wildt ungulates. In: *Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?* Watson PF, Holt W (Eds). Taylor and Francis. pp 319-348.

Holt W, North RD. 1986. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 78:447-457.

Holt W, North RD. 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 91:451-461.

Holt W, Abaigar T, Jabbour HN. 1996. Oestrus synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor Gazelle (*Gazella dama mhorri*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reprod Fert Dev*, 8:1215-1222.

Holt W, Head MF, North RD. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod* 46:1086-1094.

Holt W, Morris GJ, Coulson G, North RD. 1988. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J Exp Zool* 246:305-314.

Ibrahim MAR, Abdel H, Tóth BL, Abdin M. 1983. Effect of season and bacterial contamination on semen quality, freezability, and fertility of Hungarian simmental artificial insemination bulls. *Acta Vet Hung* 31:81-85.

Jabbour HN, Argo C, Brinklow B, Loudon A, Hooton J. 1993. Conception rates following intrauterine insemination of european (*Dama dama dama*) fallow deer does with fresh or frozen-thawed mesopotamian (*Dama dama mesopotamica*) fallow deer spermatozoa. *J Zool* 230:379-384.

Jacobson H, Bearden H, Whitehouse D. 1989. Artificial insemination trials with white-tailed deer. *J Wildl Manage* 53:224-227.

Jaczewski Z, Morstin J, Kossakowski J, Krzywinski A. 1976. Freezing the semen of red deer stags. VIII International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Krakow. Vol 4:994-997.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 70:219-228.

Johnston LA, Lacy RC. 1995. Genome resource banking for species conservation:selection of sperm donors. *Cryobiology* 32:68-77.

Jones R. 1969. Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep-frozen ram spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 22:995-1004.

Jung A, Schuppe HC, Schill WB. 2002. Comparasion of semen quality in older and younger men attending an andrology clinic. *Andrología* 34:116-122.

Juniewicz PE, Johnson BH, Bolt DJ. 1987. Effect of adrenal steroids on testosterone and luteinizing hormone secretion in the ram. *J Androl* 8:190-196.

Kaabi M, Carbajo M, Rouissi H, Anel E, Alvarez M, Boixo JC, García C, Anel L. 1999. Efecto de la consevación *post-mortem* de epidídimos de morueco sobre la evolución de malformaciones en los espermatozoides antes y después de la congelación. XXIV Jornadas Científicas de la SEOC. Soria. pp 187-191.

Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraiez P, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of the ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60:1249-1259.

Karabinus DS, Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Kaproth MT. 1990. Comparasion of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J Dairy Sci* 73:2364-2371.

Katkov II, Katkova N, Critser JK, Mazur P. 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol:chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology* 37:325-338.

Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition adn enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Rumin Res* 44:153-158.

Kosiniak K, Bittmar A. 1987. Analysis of the physiological processes connecte with sexual maturation of stallions. *Pol Archi Wet* 27:5-20.

Kramer RY, Garner DL, Bruns ES, Ericsson SA, Prins GS. 1993. Comparasion of motility and flow cytometric assessmentes of seminal quality in fresh,24-hour extended and cryopreserved human spermatozoa. *J Androl* 14:374-384.

Kruuk LEB, Slate J, Pemberton JM, Brotherstone S, Guinness F, Clutton-Brock T. 2002. Antler size in red deer: heritability an selection but no evolution. *Evolution* 56(8):1683-1695.

Krzywinski A. 1976. Collection of red deer semen with the artificial vagina. VIII Congress International of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Krakow. Vol 4:1002-1005.

Krzywinski A. 1981. Freezing of post-mortem collected semen from moose and red deer. *Acta Theriol* 26:424-426.

Krzywinski A, Jaczewski Z. 1978. Observations on the artificial breeding of red deer. *Symp Zool Soc Lond* 43:271-287.

Krzywinski A, Niedbalska A, Krzywinska K. 1987. Collection and freezing semen on the moose bull. *Swedish Wildl Res Suppl* 1:761-765.

Kumi-Diaka J, Nagaratnam V, Rwuaan JS. 1981. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. *Vet Rec* 108:13-15.

Lambrechts H, van Niekerk FE, Coetzer WA, Cloete SWP, van der Horst G. 1999. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal african buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology* 52:1241-1249.

Larson J, Miller D. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 52:445-449.

Larsson K. 1986. Evaluation of boar semen. In: Current therapy in theriogenology. Morrow D (Ed). pp 972-975.

Larsson K, Einarsson S. 1984. Seminal changes in boars after heat stress. Acta Vet Scand 25:57-66.

Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? Anim Reprod Sci 60-61:327-336.

Leibo SP, Bradley L. 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: The male gamete. Gagnon C (Ed) pp 502-516.

Leibo SP, Songsasen N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. Theriogenology 57:303-326.

Lincoln GA. 1971 (a). The seasonal reproductive changes in the Red deer stags (*Cervus elaphus*). J Zool Lond 163:105-123.

Lincoln GA. 1971 (b). Puberty in seasonally breeding male, the red deer stag (*Cervus elaphus L.*). J Reprod Fertil 25:41-54.

Lincoln GA, Youngson RW, Short RV. 1970. The social and sexual behaviour of the red deer stag. J Reprod Fertil Suppl 11:71-103.

Liu DY, Baker HWG. 1998. Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. Hum Reprod 13:905-910.

Margulis SW, Walsh A. 2002. The effects of inbreeding on testicular sperm concentration in *Peromyscus polionotus*. Reprod Fert Dev 14:63-67.

Marin P, Lönn L, Adersson B, Oden B, Olbe L, Bengtsson B, Björntorp P. 1996. Assimilation of triglycerides in subcutaneous and intraabdominal adipose tissues *in vivo* in men: effects of testosterone. J Clin Endocrinol Metab 81:1018-1022.

Marnet B, Vieitez G, Milhet P, Richoilley G, Lesourd F, Parinaud J. 2000. Computer-assisted assessment of sperm morphology:comparasion with conventional techniques. Int J Adrol 23:22-28.

Marshall TC, Spalton JA. 2000. Simultaneous inbreeding and outbreeding depression in reintroduced Arabian oryx. *Anim Conserv* 3:241-248.

Mathevon M, Buhr MM, Dekkers JCM. 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in holstein bulls. *J Dairy Sci* 81:3321-3330.

Maxwell W, Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42:55-65.

Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:125-142.

Mazur P, Leibo P, Chu E. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp Cell Res* 71:345-355.

Mazur P, Rall WF, Rigopoulos N. 1981. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Biophys J* 36:653-675.

McGrady AV. 1984. Effects of psychological stress on male reproduction: a review. *Arch Androl* 13:1-7.

McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. 1992. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J Reprod Fert* 92:527-534.

Medrano A. 1998. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. Thesis. University of London. 203 pp.

Medrano A, Watson PF, Holt W. 2002. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction* 123:315-322.

Miles P, Sympson P, Allende R. 1992. Recuperación de esperma de ciervo colorado postmortem (*Cervus elaphus* Lin) y su criopreservación en nitrógeno líquido. *Rev Arg Prod Anim* 12:57-64.

Millete CF. 1999. Spermatozoa. In: Encyclopedia of Reproduction. Knobil E, Neill JD (Eds). Academic Press. pp 586-596.

Mirarchi R, Scanlon P, Kirkpatrick R. 1977. Annual changes in spermatozoan production and associated organs of White-Tailed deer. J Wildl Manage 41:92-99.

Mitchell B. 1963. Determination of age in Scottish red deer from growth layers in dental cement. Nature. 198:350.

Monfort SL, Asher GW, Wildt DE, Wood TC, Schiewe MC, Williamson LR, Bush M, Rall WF. 1993. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. J Reprod Fert 99:459-465.

Mortimer D. 1994. Practical Laboratory Andrology. Oxford University Press. 393 pp.

Mossad H, Morshedi M, Toner JP, Oehninger S. 1994. Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination. Arch Androl 33:51-57.

Mulley R, Moore N, English A. 1988. Successful uterine insemination of fallow deer with fresh and frozen semen. Theriogenology 29:1149-1153.

Naitana S, Ledda S, Leoni G, Bogliolo L, Loi P, Cappai P. 1997. Fluorescent staining to assess membrane integrity and in vitro viability of frozen-thawed sperm in mouflon (*Ovis Gmelini Musimon*). Proc 2nd Int Symp on Mediterranean Mouflon. 176-180.

Nakagata N, Takeshima T. 1993. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. Exp Anim 42:317-320.

Neild D, Chaves G, Flores M, Miragaya M, Gonzalez E, Agüero A. 2000. The Host test and its relationship to fertility in the stallion. Andrología 32:351-355.

Nikodémusz E, Imre R, Bálo M. 1986. Spermatogenesis and sperm count in the red deer, *Cervus Elaphus* L Zool Jb Anat 114:263-268.

Noiles EE, Thompson KA, Storey BT. 1997. Water permeability, L_p , of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. Cryobiology 35:79-92.

Norman RL. 1993. Effects of corticoprin-releasing hormone on luteinizing hormone, testosterone, and cortisol secretion in intact male rhesus macaques. Biol Reprod 49:148-153.

Nothling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH. 1997. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. J Reprod Fert Suppl 51:109-116.

O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod 17:704-709.

Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Pérez M, Cebrian-Pérez J. 1996. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. Int J Androl 19:287-292.

Ollero M, Perez-Pe T, Muiño-Blanco T, Cebrian-Pérez J. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. Cryobiology 37:1-12.

Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O. 1995. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. Hum Reprod 1:543-557.

Ortiz, N. 1999. Estudio de las características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico obtenidos postmortem. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. 283 pp.

Park CS, Yi YJ. 2002. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim Reprod Sci* 73:53-61.

Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222.

Parks JE, Lynch D. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255-266.

Patt J, Narth J. 1969. Effects of diluents, equilibration time and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology* 5:385-392.

Peña A, Lincoln GA. 2000. Effects of equex. one-or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54:859-875.

Pérez LJ, Valcárcel MA, de las Heras MA, Moses D, Baldassarre H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46:131-140.

Pérez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, García-Casado P. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398.

Platz C, Magyar S, Crider N, Densmore M, Wiley G, Bowen M, Templeton J, Kraemer D. 1982. Cryopreservation of electroejaculated and epididymal spermatozoa in white tail deer (*Odocoileus virginianus*). *Am Assoc Zoo Vet* 127-129.

Pignatelli D, Ferreira J, Vendeira P, Magalhaes MC, Vinson GP. 2002. Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the adrenal cortex. *Endocr Res* 28:683-691.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 169:626-627.

Pontbriand D, Howard J, Schiewe M, Stuart L, Wildt D. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26:341-354.

Preston BT, Stevenson IR, Pemberton JM, Wilson K. 2001. Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature* 409:681-682.

Pritchard J, Després JP, Gagnon J, Tchernof A, Nadeau A, Tremblay a, Bouchard C. 1998. Plasma adrenal, gonadal, and conjugated steroids before and after long term overfeeding in identical twins. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3277-3284.

Pukazhenth B, Spindler R, Wildt DE, Bush M, Howard J. 2002. Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleimorphisms:influence of adding and removing cryoprotectant. *Cryobiology* 44:288-300.

Pukazhenth B, Noiles E, Pelican K, Donoghue A, Wildt D, Howard J. 2000. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology* 40:139-150.

Pursel V, Johnson LA. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1:63-68.

Quinn PJ, White I. 1967. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. *Aust J Biol Sci* 20:1205-1215.

Quinn PJ, Salamon S, White I. 1968. The effect of cold shock and deep freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. *Aus J Biol Sci* 19:119-128.

Quintero-Moreno A, Miró J, Rigau T, Rodriguez-Gill JE. 2002. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59 (9): 1973-1990.

Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motility characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of Buffalo spermatozoa. *J Androl* 22:278-283.

Rath D, Niemann H. 1997. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47:785-793.

Riney T. 1955. Evaluating condition of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*), with special reference to New Zealand. *N Z J Sci Technol* 36:429-463.

Robaire B, Hermon L. 1998. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). Raven Press. pp 999-1080.

Robertson L, Watson PF. 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J Reprod Fert* 77:177-185.

Robertson L, Watson PF. 1987. The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. *Anim Reprod Sci* 15:177-187.

Roldan ERS, 1996. Preparación de los espermatozoides para la fecundación en mamíferos. En: *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal*. Garde JJ, Gallego L, (Eds). Universidad de Castilla-La Mancha. pp 11-29.

Roldan ERS, Harrison R. 1989. Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca^{2+} /ionophore induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 259:397-406.

Roldan ERS, Cassinello J, Abaigar T, Gomendio M. 1998. Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proc R Soc Lond B* 265:243-248.

Roth T, Bush LM, Wildt D, Weiss RB. 1999. Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine in vitro fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapor. *Biol Reprod* 60:493-498.

Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Lansac J. 1991. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int J Androl* 14:328-332.

Royere, D., Bartherlemy, C., Hamamah, S, and Lansac, J. 1996. Cryopreservation of spermatozoa: a review. *Hum Reprod Update* 2(6):553-559.

Russell OD, Drobnis E, Overstreet J. 1995. Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fert Steril* 63:1051-1057.

Salamon S, Maxwell W. 1995 (a). Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37:185-249.

Salamon S, Maxwell W. 1995 (b). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 38:1-36.

Salisbury GW, VanDemark NL, Logde JR. 1961. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Editorial Acribia. 831 pp.

Schwarzer JU, Fiedler K, Hertwig Iv I, Krusmann G, Wurfel W, Muhlen B, Pickl U, Lochner-Ernst D, Schleyer M, Ovens-Rader A, Henning M. 2003. Male factors determining the outcome of intracytoplasmic sperm injection with epididymal and testicular spermatozoa. *Andrología* 35: 220-226.

Shams-Borham G, Harrison R. 1981. Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gam Res* 4:407-432.

Shamsuddin M, Amiri Y, Bhuiyan MMU. 2000. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reprod Dom Anim* 35:53-57.

Sharma RK, Nelson AJ, Thomas AJ, Agarwal A. 2001. New semen scores are effective measures of semen quality. *Fert Steril* 76:S115.

Shively C, Kaplan J. 1984. Effects of social factors on adrenal weight and related physiology of *Macaca fascicularis*. *Physiol Behav* 33:777-782.

Soler AJ, Garde JJ. 2003. Relationship between the characteristics of epididymal red deer spermatozoa and penetrability into zona-free hamster ova. *J Androl* 24:393-400.

Soler AJ, Perez-Guzman M, Garde JJ. 2003 (a). Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability and morphological integrity. *J Exp Zool* 295A:188-199.

Soler AJ, García A, Fernández-Santos MR, Esteso MC, Garde JJ. 2003 (b). Effects of thawing procedure on postthawed in vivo fertility and in vitro viability of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *J Androl* 24:58-68.

Soler AJ, Astore V, Sestelo A, Rivolta M, Jácome LN, Garde JJ. 2003 (c). Effect of thawing procedure on cryosurvival of deer spermatozoa: work in progress. *Theriogenology* 60:511-520.

Songsasen N, Leibo P. 1997. Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* 35:255-269.

Spallanzani L. 1776. Opuscoli di fisica animale e vetetebile. Vols 2, Opuscolo II. Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermatice del Vomo Degli Animali. Modena Presso La Societa Tipographica.

Strzezek J, Krzywinski A, Swidowicz K. 1985. Seasonal changes in the chemical composition of red deer (*Cervus elaphus*) semen. *Anim Reprod Sci* 9:195-204.

Strzezek J, Kordan W, Glogowski J, Wysocki P, Borkowski K. 1995. Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reprod Dom Anim* 30:85-94.

Szász F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti L, Gadella BM. 2000. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev* 55:289-298.

Sztejn J, Farley J, Mobraaten L. 2000. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod* 63:1774-1780.

Talbot P, Chacon R. 1981. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 215:201-208.

Tamuli M, Watson PF. 1994. Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci* 35:247-254.

Tan RS, Pu SJ. 2002. Impact of obesity on hypogonadism in the andropause. *Int J Androl* 25:195-201.

Tanemura K, Kurohmaru M, Kuramoto K, Hayashi Y. 1993. Age-related morphological changes in the testis of the BDF1 Mouse. *J Vet Med Sci* 55:703-710.

Tchernof A, Després JP, Belanger A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S, Lupien PJ, Labrie F. 1995. Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men. *Metabolism* 44:513-519.

Tchernof A, Labrie F, Bélanger A, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay a, Nadeau A, Després JP. 1997. Androstane-3 α , 17 β - Diol glucuronide as a steroid correlate of visceral obesity in men. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1528-1534.

Templeton AR. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. In: *Conservation biology-the science of scarty and diversity*. Soulé ME (Ed). M.A.:Sinauer Assciates. pp 105-116.

Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 58:786-793.

Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft R. 2001. The use in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Anim Reprod Sci* 65:181-192.

Thurston LM, Watson PF, Holt W. 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automate sperm morphology analysis system. *J Reprod Fert* 117:271-280.

Thurston LM, Watson PF, Holt W. 2002 (a). Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryoletters* 23:255-262.

Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt W. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourie shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl* 22:382-394.

Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt W. 2002 (b). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. Biol Reprod 66:545-554.

Upreti GC, Payne SR, Duganzich DM, Oliver JE, Smith J. 1996. Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. Anim Reprod Sci 41:27-36.

Valcárcel A, de las Heras MA, Pérez L, Moses D, Baldassarre H. 1997. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. Anim Reprod Sci 45:299-309.

van der ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Perez-Pelaez M, Diedrich K, Zaneveld LJD. 1986. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. J Androl 7:190-196.

Veldhuizen, F. 1994. Studies cryopreservation of semen of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). Thesis of Master. Lincoln University. 159 pp.

Vermeulen A, Kaufman JM, Deslypere JP, Thomas G. 1993. Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. J Clin Endocrinol Metab 76:1140-1146.

Watson PF. 1978. A review of techniques of semen collection in mammals. Symp Zool Soc Lond 43:97-126.

Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology. Oxford University Press. pp 283-351.

Watson PF. 1981 (a). The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: The effects of low temperatures on biological membranes. Morris GJ, Clark A (Eds). Academic Press. pp 189-218.

Watson PF. 1981 (b). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fert* 62:483-492.

Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 7:871-891.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61:481-492.

Watson PF, Duncan AE, 1998. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram sperm. *Cryobiology* 25:131-142.

Watson PF, Fuller BJ. 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos. In: *Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?* Watson PF, Holt W (Eds). Taylor and Francis. pp 23-46.

Watson PF, Martin I. 1972. A comparison of changes in the acrosomes of deep frozen ram and bull spermatozoa. *J Reprod Fert* 28:99-101.

Watson PF, Plummer JM. 1985. Responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: *Deep freezing of boar semen.* pp 113-127.

Watson PF, Jones PS, Plummer JM. 1991. A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. *Anim Reprod Sci* 24:93-108.

Watson PF, Kunze E, Cramer P, Hammerstidt RH. 1992. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *J Androl* 13:131-138.

Way A, Griel L, Killian G. 2000. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 21:213-219.

Way A, Henault M, Killian G. 1994. Comparasion of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology* 43:1301-1316.

White I. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fert Dev* 5:639-658.

Wildt DE, Rall WF, Critser J, Monfort SL, Seal US. 1993. Genome resource banks: Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* 47:689-698.

Wildt DE, Pukazhenthhi B, Brown J, Monfort S, Howard J, Roth T. 1995. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod Fert Dev* 7:811-824.

Windsor DP, White I. 1995. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci* 40:43-58.

Windt ML, Coetzee K, Kruger TF, Menkveld R, van der Merwe JP. 2002. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa men with azoospermia. *J Assit Reprod Genet* 19:53-59.

Wood S, Thomas K, Schnauffer K, Troup S, Kingsland C, Lewis-Jon. 2002. Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients. *Fert Steril* 77:1162-1166.

Xu XF, De Pergola G, Bjorntorp P. 1991. Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* 128:379-382.

Yanagimachi R. 1988. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds) Plenum Press. pp 135-185.

Yeung CH, Sonnenberg-Riethmacher E, Cooper TG. 1999. Infertile spermatozoa of *c-ros* tyrosine kinase receptor knockout mice show flagellar angulation and maturational defects in cell volume regulatory mechanisms. Biol Reprod 61:1062-1069.

Zaneveld LJD, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. 1991. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum Reprod 6:1265-1274.

Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW, Moo-Young AJ. 2000. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells:a quantitative immunohistochemical study. Biol Reprod 63:368-376.

Zomborszky Z, Zubor T, Toth J, Horn P. 1999. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilisation of sperm frozen and subsequently thawed. Acta Vet Hung 47:263-270.

ANEXOS

Solución Tampón Fosfato Salino (PBS)

Reactivo	g/l
Cloruro de sodio	8
Cloruro potásico	0,2
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,1
Cloruro de calcio	0,1
Fosfato disódico	1
Fosfato monosódico	0,15
Fosfato de potasio	0,2
Albúmina sérica bovina (Fracción V)	5

Solución hipoosmótica (100mOsm)

Reactivo	g/100 ml
Citrato de sodio	1,02

Solución para la prueba de resistencia térmica

Reactivo	
Citrato de sodio 2,92%	80 ml
Yema de huevo	20 ml

Solución fijadora (2% glutaraldehído en 0,165 M de cacodilato de Na)

Reactivo	
Glutaraldehído 25%	0,08 ml
Cacodilato de sodio 0,33 M	0,5 ml
Agua destilada mili-Q	0,42 ml